MINISTERUL EDUCAȚIEI ȘI ÎNVĂȚĂMÎNTULUI
SOCIETATEA DE ȘTIINȚE BIOLOGICE

Prof. dr. I. ANGHEL

Conf. dr. doc. D. MIȘCALENCU
Lector dr. ALEXANDRINA POPESCU
Lector dr. L. GAVRILĂ
Lector dr. LOTUS MEȘTER
Lector dr. MARIA NĂSTĂSESCU
Lector dr. FLORICA MAILAT
Lector dr. G. NĂSTĂSESCU
Lector dr. CONSTANȚA TUDOR

Asist. dr. TATIANA VASSU
Asist. dr. DONCA SONIA
Biolog pr. dr. G. MOHAN
Prof. gr. I. A. TALABA

PRACTICUM DE BIOLOGIE

Coordonarea lucrării:
Prof. dr. I. ANGHEL
Lector dr. C. VOICA

BUCUREȘTI
1989

MINISTERUL EDUCAȚIEI ȘI ÎNVĂȚĂMÎNTULUI
SOCIETATEA DE ȘTIINȚE BIOLOGICE

Prof. dr. I. ANGHEL

Conf. dr. doc. D. MIȘCALENCU
Lector dr. ALEXANDRINA POPESCU
Lector dr. L. GAVRILĂ
Lector dr. LOTUS MEȘTER
Lector dr. MARIA NĂSTĂSESCU
Lector dr. FLORICA MAILAT
Lector dr. G. NĂSTĂSESCU
Lector dr. CONSTANȚA TUDOR

Asist. dr. TATIANA VASSU
Asist. dr. DONCA SONIA
Biolog pr. dr. G. MOHAN
Prof. dr. L A. TALABA

PRACTICUM DE BIOLOGIE

II. BIOLOGIE ANIMALĂ

Coordonarea lucrării :
Prof. dr. I. ANGHEL
Lector dr. C. VOICA

BUCUREȘTI
1989

CUPRINS

1. TEHNICI PENTRU STUDIUL MORFOLOGIEI ŞI ANATOMIEI NEVERTEBRATELOR (lector dr. Maria Năstăsescu) 11
1.1. *Încrengătura protozoare* (Protozoa) 11
1.1.1. Metode de colectare şi preparare 13
1.2. *Încrengătura spongieri (Spongia)* 18
1.2.1. Metode de colectare şi preparare 19
1.3. *Diviziunea celenterate (Coelenterata)* 21
1.3.1. Metode de colectare şi preparare 24
1.4. *Încrengătura platelminţi (Plathelminthes)* 26
1.5. *Încrengătura nemertieni* 33
1.5.1. Metode de colectare şi preparare 33
1.6. *Încrengătura nematelminţi (Nemathelminthes)* 34
1.6.1. Metode de colectare şi preparare 37
1.7. *Încrengătura moluşte (Mollusca)* 39
1.7.1. Metode de colectare şi preparare 47
1.7.2. Colecţii de specii comune de moluşte din fauna ţării noastre . . 49
1.7.2.1. *Clasa Gasteropode (Gasteropoda)* 49
1.7.2.1.1. Subclasa Prosobranchiate (Prosobranchiata) 50
Ordinul Monotocarde (Ctenobranchiata) 50
1.7.2.1.2. Subclasa Pulmonate (Pulmonata) 51
Ordinul Basomatofore (Bassomatophora) 51
Ordinul Stilomatofore (Stylomatophora) 52
1.7.2.2. Clasa Lamellibranchiate 53
Ordinul Eulamellibranchiate 54
Ordinul Anizomiare (Anysomyarya) 58
1.8. *Încrengătura Anelide (Anelida)* 59
1.8.1. Metode de colectare, preparare 68
1.9. *Încrengătura Artropoda* 69
1.9.1. Metode de colectare, conservare, preparare 83
2. COLECTAREA, PREPARAREA ŞI CONSERVAREA INSECTELOR (lector dr. Constanţa Tudor) 89
2.1. *Clasa Insecta* 89
3. CREŞTEREA VIERMILOR DE MĂTASE *(Bombyx mori)* (Lector dr. Constanţa Tudor) 114
3.1. *Produse şi deşeuri* 122
3.2. *Creşterea viermilor de mătase în sistem industrial (intensiv)* . . 122
3.3. *Creşterea viermilor de mătase în cadrul şcolilor, C.A.P.-urilor şi gospodăriilor populaţiei* 123
3.4. *Creşteri succesive (repetate) de viermi de mătase* 123
3.5. *Bolile contagioase* 128
3.5.1. Paraziţoze 128
3.5.2. Micoze 129
3.5.3. Bacterioze 129
3.5.4. Viroze 129
3.6. *Bolile necontagioase* 131
3.7. *Dăunători* 132
3.8. *Baza furajeră sericicolă* 133

4. APIS MELLIFICA L. ÎNGRIJIRE, CREȘTERE, ÎNMULȚIRE, RESURSE MELIFERE, PRODUSE APICOLE, BOLI ȘI DĂUNĂTORI (Lector dr. Constanța Tudor) 134
4.1. *Întreținerea familiilor de albine în perioada de dezvoltare* . . . 141
4.2. *Întreținerea familiilor de albine în perioada culesurilor* . . . 142
4.3. *Întreținerea familiilor de albine în vederea iernării și iernarea lor* 144
4.4. *Înmulțirea familiilor de albine* 148
4.5. *Resursele melifere* 148
4.5.1. Plantele melifere forestiere 149
4.5.2. Plantele melifere agricole cultivate 149
4.5.3. Plantele melifere erbacee spontane din păduri, fînețe și pășuni . 150
4.6. *Produse apicole* 150
4.7. *Bolile contagioase* 154
4.7.1. Bacterioze 154
4.7.2. Viroze 156
4.7.3. Micoze 157
4.7.4. Parazitoze 157
4.8. *Boli necontagioase* 159

5. COLECTAREA, STUDIEREA ȘI OBSERVAREA VERTEBRATELOR (Lector dr. Alexandrina Popescu, lector dr Lotus Meșter) 161
5.1. *Colectarea și păstrarea materialului viu în laborator* 161
5.2. *Metoda folosite pentru determinarea vîrstei* 172
5.2.1. Metode de determinarea vîrstei la peștii osoși 173
5.2.2. Metode de determinarea vîrstei la amfibieni 175
5.2.3. Metode de determinarea vîrstei la reptile 176
5.2.4. Metode de determinarea vîrstei la păsări 177
5.2.5. Metode de determinarea vîrstei la mamifere 180
5.3. *Disecția — metodă de studierea organizației interne* 182
5.3.1. Disecția la pești osoși (Clasa Osteichthyes — supraordinul Teleostei) 183
5.3.1.1. Dispoziția generală a organelor interne 184
5.3.1.2. Sisteme de organe 185
5.3.2. Disecția la amfibieni (clasa Amphibia — ordinul Anura) . . . 187
5.3.2.1. Dispoziția generală a organelor interne 189
5.3.2.2. Sisteme de organe 189
5.3.3. Disecția la reptile (clasa Reptilia — ordinul Squamata) 192
5.3.3.1. Dispoziția generală a organelor interne 193
5.3.3.2. Sisteme de organe 193
5.3.4. Disecția la păsări (clasa Aves — ordinul Columbiformes) . . . 195
5.3.4.1. Tip reprezentativ Columbia livia (porumbel) 196
5.3.4.2. Dispoziția generală a organelor interne 198
5.3.4.3. Sisteme de organe 198
5.3.5. Disecția la mamifere (clasa Mammalia — ordinul Lagomorpha) . 201
5.3.5.1. Tip reprezentativ Oryctolagus cuniculus (iepure de casă) . . 201
5.3.5.2. Dispoziția generală a organelor 203
5.3.5.3. Sisteme de organe 203
5.4. Prepararea și conservarea vertebratelor ca piese de colecție . . 207
5.4.1. Prepararea scheletelor 207
5.4.2. Preparate umede 210
5.4.3. Conservarea sub formă de balguri 212
5.4.3.1. Confecționarea balgurilor la păsări 213
5.4.3.2. Confecționarea balgurilor la mamifere 213
5.5. *Naturalizarea* 214
5.5.1. Tehnica împăierii 215
5.5.2. Împăierea peștilor 216
5.5.3. Împăierea amfibienilor 217
5.5.4. Împăierea broaștelor țestoase 218
5.5.5. Împăierea păsărilor 221
5.5.6. Împăierea mamiferelor mici și mijlocii 229
5.6. *Confecționarea microdioramelor* 233

6. TEHNICA CONFECȚIONĂRII PREPARATELOR MICROSCOPICE DE STRUCTURI ANIMALE (Conf. dr. doc. D. Mișcalencu, lector dr. Florica Mailat) 236
6.1. *Metode pentru evidențierea condriomului* 245
6.2. *Metode pentru evidențierea complexului Golgi* 247
6.3. *Metode pentru colorarea țesutului conjunctiv* 248
6.4. *Metode pentru evidențierea fibrelor de reticulină* 249
6.5. *Metode pentru evidențierea fibrelor elastice* 251
6.6. *Metode pentru evidențierea țesutului nervos* 252
6.7. *Metode de evidențiere a acizilor nucleilor* 254
6.8. *Metode pentru evidențierea glicogenului* 255
6.9. *Metode pentru evidențierea lipidelor* 256
6.10. *Metode pentru colorarea frotiului de sînge* 257
7. STUDIUL CROMOZOMILOR LA ANIMALE (Lector dr. L. Gavrilă) 258
7.1. *Prepararea cromozomilor din sîngele periferic* 258
7.2. *Prepararea cromozomilor din culturi limfocitare* 260
7.3. *Prepararea cromozomilor din suspensii celulare* 261
7.3.1. Colorarea clasică, ortodoxă sau convențională 262
7.3.2. Analiza microscopică a preparatelor citogenetice 262
7.3.3. Microfotografierea 263
7.4. *Metode de bandare* 264
7.4.1. Bandarea „Q" 265
7.4.2. Bandarea „G" 265
7.4.3. Bandarea „R" 267
7.4.4. Bandarea „C" 267
7.4.6. Tehnici de bandare amestecate 267
7.4.5.1. Bandarea CT 268
7.4.7. Detalii privind folosirea metodelor de bandare 268
7.4.6.1. Metode de bandare „Q" 268
7.4.6.2. Bandarea „Q" prin denaturare termică 269
7.4.6.3. Bandarea „Q" prin metoda ASG 269
7.4.6.4. Bandarea G cu tripsină 270
7.4.8. Metode de bandare R 270
7.4.7.1. Bandarea R prin colorare cu Giemsa 271
7.4.7.2. Bandarea R prin colorare cu acridine-orange 271
7.5. *Evidențierea heterocromatinei constitutive* 271
7.6. *Metode de evidențiere a dsincroniei replicative a diferitelor regiuni ale cromozomilor* 273
7.7. *Metoda SCE (sister chromatid exchanges)* 274
8. METODE PENTRU STUDIUL CROMOZOMILOR URIAȘI LA DROSOPHILA MELANOGASTER (Prof. dr. I. Anghel) 280
9. DEMONSTRAREA EXPERIMENTALĂ A LEGILOR MENDELIENE ȘI A TEORIEI CROMOZOMICE PRIN TEHNICI DE ANALIZĂ GENETICĂ LA DROSOPHILA MELANOGASTER (Prof. dr. I. Anghel, prof. gr. I A. Talabă) 285
9.1. *Ciclul de viață* 285
9.2. *Metode de creștere în laborator* 287
9.3. *Încrucișări experimentale* 291
9.3.1. Monohibridarea 291
9.3.2. Dihibridarea 294
9.3.3. Trihibridarea 297
9.4. *Interpretarea matematică a rezultatelor experimentale* 299
9.5. *Evidențierea fenomenului de înlănțuire a genelor plasate pe același cromozom* (fenomenul de linkage) 300
9.6. *Evidențierea fenomenului de interacțiune a genelor* 302
9.7. *Evidențierea fenomenului de crossing-over* 304
9.8. *Evidențierea fenomenului de sex-linkage* 307
10. LUCRĂRI PRACTICE DE FIZIOLOGIE ANIMALĂ (Lector dr. G. Năstăsescu) 309
10.1. *Fiziologie neuro-musculară* 309
10.2. *Experiența în legătură cu fiziologia organelor de simț* 316

10.3. *Fiziologia digestiei* . . . 320
10.4. *Singele* . . . 321
10.5. *Fiziologia circulației* . . . 323
10.6. *Fiziologia respirației* . . . 325
10.7. *Fiziologia endocrină* . . . 329
10.7.1. Acțiunea tiroidei asupra macromoleculelor de broască . . . 329
10.7.2. Diagnosticul endocrin al sarcinei . . . 329
10.8. *Fiziologia excreției* . . . 331

11. TEHNICI DE LABORATOR FOLOSITE ÎN MICROBIOLOGIE (Asist. dr. Donca Sonia, asist. dr. Tatiana Vassu) . . . 332
11.1. *Metode de sterilizare* . . . 332
11.1.1. Sterilizarea cu ajutorul agenților fizici . . . 333
11.1.1.1. Metode de sterilizare prin căldură . . . 333
Sterilizarea prin căldură uscată . . . 333
Incinerarea sau arderea . . . 333
Încălzirea pînă la roșu . . . 333
Sterilizarea prin flambare . . . 334
Sterilizarea prin aer cald . . . 335
Sterilizarea prin căldură umedă . . . 335
Fierberea . . . 335
Pasteurizarea . . . 336
Tindalizarea . . . 336
Sterilizarea prin vapori de apă sub presiune . . . 336
11.1.1.2. Filtrarea . . . 336
11.1.1.3. Sterilizarea cu radiații ultraviolete . . . 337
11.1.1.4. Sterilizarea cu ultrasunete . . . 338
11.1.2. Sterilizarea cu ajutorul agenților chimici . . . 338
11.2. *Medii de cultură* . . . 338
11.2.1. Principii privind mediile de cultură . . . 338
11.2.2. Principalele ingrediente care intră în compoziția unui mediu de cultură uzual . . . 339
11.2.3. Etapele preparării unui mediu de cultură . . . 342
11.2.4. Cultivarea în condiții de aerobioză și anaerobioză . . . 344
11.2.5. Conservarea mediilor de cultură . . . 344
11.3. *Metode de recoltare, conservare și transport a produselor patologice* . . . 345
11.4. *Însămînțarea microorganismelor* . . . 347
11.4.1. Tehnici de însămînțare . . . 347
11.4.1.1. Tehnica însămînțării în medii lichide . . . 349
Însămînțarea unui mediu lichid dintr-o cultură microbiană în mediu lichid . . . 349
Însămînțarea unui mediu lichid dintr-o cultură microbiană în mediu solid . . . 349
11.4.1.2. Însămînțarea unui mediu de cultură solid . . . 350
Însămînțarea unui mediu solid înclinat în tuburi . . . 350
Tehnica însămînțării în pînză . . . 351
11.5. *Tehnici de izolare a microorganismelor în cultură pură* . . . 352
11.5.1. Tehnica săråcirii sau epuizării ansei . . . 352
11.5.2. Tehnica însămînțării diluțiilor zecimale prin încorporare . . . 353
11.6. *Incubarea și conservarea microorganismelor* . . . 355
11.7. *Examenul culturilor și al colonițlor bacteriene* . . . 356
11.8. *Tehnici de microscopie — microscopul cu imersie* . . . 360
11.9. *Examenul microscopic al bacteriilor* . . . 362
11.9.1. Examenul microscopic al bacteriilor în stare vie . . . 362
11.9.2. Examenul microscopic pe frotiuri colorate . . . 363
11.9.3. Metode de colorare . . . 365
11.9.3.1. Metoda coloratiei simple . . . 367
11.9.3.2. Coloratii compuse . . . 368
11.9.3.3. Coloratii speciale . . . 370
Colorarea peretelui celular . . . 370
Colorarea sporului bacterian . . . 370
Colorarea capsulei . . . 372
Colorarea incluziilor bacteriene . . . 373

11.10. *Cultura în laborator a microorganismelor eucariote* 374
11.10.1. Algele microscopice — caracteristici generale 374
11.10.2. Medii de cultură pentru dezvoltarea algelor microscopice . . . 375
11.10.3. Drojdiile — caracteristici generale 376
11.10.4. Aspecte privind fiziologia drojdiilor 377
11.10.5. Medii de cultură pentru dezvoltarea drojdiilor 378
11.10.6. Mucegaiurile — caracteristici generale 378
11.10.7. Cultivarea în laborator a mucegaiurilor 380
11.10.8. Protozoarele 381

12. INCLUDEREA MATERIALULUI BIOLOGIC ÎN RĂȘINI SINTETICE (Biolog pr. dr. G. Mohan) 383
12.1. *Modul de lucru* 384
12.1.1. Alegerea și pregătirea materialului biologic 384
12.2. *Modul de pregătire a diverselor materiale biologice* 385
12.2.1. Plante 385
12.2.2. Animale 385
12.2.3. Pregătirea formelor pentru incluziuni 386
12.2.4. Prepararea rășinii 386
12.2.5. Turnarea stratelor 388
12.2.6. Finisarea 388
12.2.7. Normele de securitate 389

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ 390

PREFAȚĂ

Perfecționarea și modernizarea învățămîntului de biologie, trezirea interesului și dezvoltarea pasiunii pentru studiul științelor biologice nu se pot realiza decît prin o corelare deplină între cunoștințele teoretice și activitățile practice. Din această perspectivă se impune ca cele mai multe lecții să se bazeze pe observația directă a morfologiei și anatomiei diferiților reprezentanți ai grupelor respective de plante și animale și pe efectuarea de experiența sau activități practice. În același timp se impune valorificarea mai bună a deplasărilor pe teren și a practicii productive din agricultură sau lotul școlar pentru consolidarea cunoștințelor teoretice și pentru formarea unor deprinderi de muncă independentă.

Între acțiunile întreprinse de Societatea de Științe Biologice de a sprijini eforturile cadrelor didactice, pentru continua perfecționare a învățămîntului biologic se înscrie publicarea a 4 volume cu referate de sinteză — *Probleme actuale de biologie* și a acestui manual de lucrări practice în 2 volume. Sînt prezentate lucrări practice de laborator pentru toate disciplinele biologice care se studiază în învățămîntul gimnazial și liceal : morfologia și anatomia plantelor și animalelor, fiziologia omului și a plantelor, genetica. De un real folos sînt capitolele care se referă la viermele de mătase și albine — creșterea acestora reprezentînd preocupări constante ale elevilor și profesorilor de biologie. Față de lucrările care au apărut anterior, în editura didactică și pedagogică sau în cadrul institutelor de învățămînt superior, prezentul manual se remarcă prin diversitatea problematicii lucrărilor și ilustrația bogată.

În același timp numeroase tehnici de citologie, genetică, fiziologie, microbiologie pot fi utilizate în procesul de elaborare a lucrărilor de grad și în cercetarea științifică. Prin bogatul său conținut manualul va putea fi folosit și de studenții din învățămîntul universitar biologic, farmaceutic, agricol, veterinar, silvic.

Exprimăm cele mai alese mulțumiri prof. dr. I A. T a l a b ă, pentru tru amabilitatea, promptitudinea și competența cu care a acceptat să analizeze conținutul lucrării și să testeze posibilitatea folosirii tehnicilor în cadrul lecțiilor sau cercurilor de biologie.

Ne exprimăm convingerea că eforturile noastre vor fi apreciate de colegii noștri din învățămîntul gimnazial și liceal care prin sugestiile pe care vor avea amabilitatea să le facă vor contribui la îmbunătățirea unei eventuale ediții.

Prof. I. ANGHEL
Președintele Societății de Științe Biologice

1. TEHNICI PENTRU STUDIUL MORFOLOGIEI ŞI ANATOMIEI NEVERTEBRATELOR

1.1. INCRENGĂTURA PROTOZOARE (PROTOZOA)

Protozoarele cuprind organisme unicelulare, euçariote (mono sau polienergide), cu diferenţieri citoplasmice denumite organite în vederea îndeplinirii funcţiilor vitale. Nutriţia autotrofă şi heterotrofă (osmotrofă şi fagotrofă), reproducerea asexuată obligatorie, iar cea sexuată facultativă.

Forme libere sau fixate, solitare sau soloniale, extrem de variate din punct de vedere ecologic. Speciile libere trăiesc în apa dulce, marină şi salmastră, în muşchiul şi pămîntul umed. Multe forme sînt simbionte, comesale şi parazite.

Studiul protozoarelor este destul de dificil. Este indicat şi chiar preferabil ca observaţiile să se facă pe viu, deoarece prin fixare se distrug mulţi constituenţi celulari. Observaţia pe viu este completată prin studiul preparatelor microscopice permanente.

Tip de structură : *Amoeba proteus* (Clasa Rhizopoda).
Paramaecium candatum (Clasa Ciliata).

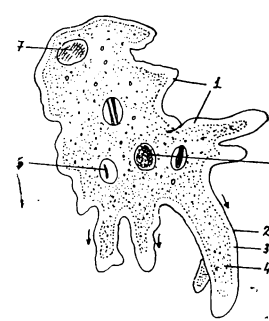


Fig. 1. Amoeba proteus : 1 — pseudopoe ; 2 — membrană plasmatică ; 3 — ectoplasma ; 4 — endoplasma ; 5 — nucleu ; 6 — vacuolă digestivă ; 7 — vacuolă contractilă.

Amoeba proteus (Chaos diffluens, Fig. 1), este specie comună în apele dulci, putînd fi colectată de pe partea inferioară a frunzelor plantelor acuatice. Trăieşte la suprafaţa apelor stagnante şi infuziilor, hrănindu-se cu organisme mici, vegetale şi animale.

Măsoară pînă la 500 μ. În cîmpul microscopului apare ca o masă viscoasă, refringentă, care în mişcare îşi schimbă mereu forma prin emiterea de numeroase pseudopode scurte, digitiforme, din care unul este anterior mai mare şi aplatizat. La exterior, prezintă o membrană plasmatică sau plasmalemă semipermeabilă. Citoplasma prezintă 2 zone: una periferică, hialină, ectoplasma sau hialoplasma, şi alta centrală densă, vacuolară, endoplasma sau granuloplasma. Nucleul este elipsoidal sau discoidal, cu o membrană vizibilă şi cu un endosom mare.

În vecinătatea nucleului se observă o vacuolă contractilă sau pulsatilă. Citoplasma este bogată în incluziuni, a căror abundenţă depinde de natura hranei. Printre incluziuni se găsesc vacuolele digestive care circulă în celulă, fiind purtată de curenţii citoplasmatici (cicloză).

Amoeba proteus este fagotrofă; se hrăneşte cu protozoare, alge (Diatomee), mici metazoare (Rotiferi, crustacei) şi particule inerte ca silice, amidon etc. Digestia se efectuează în 13—24 ore. Pentru evidenţierea procesului de digestie se colorează cu roşu neutru.

La început vacuolele digestive se colorează în roşu intens, indicînd faza acidă a digestiei, apoi culoarea virează spre portocaliu şi brun, marcînd faza alcalină. Resturile nedigerate sînt eliminate printr-un punct oarecare de pe suprafaţa corpului numit citoproct sau citopyge (anus celular).

Amoebele pot suporta o inaniţie prelungită pînă la 21 zile.

Paramaecium caudatum (Paramaecium, Fig. 2) de 100—300 μ, este oval-alungit cu cili dispuşi uniform pe suprafaţa corpului. Ventral şi pe partea stîngă prezintă o adîncitură sau *peristom*, care inferior are un orificu numit citostom (gura celulară). Aceasta se continuă cu un canal, citofaringe (faringe celular) în care bate o membrană ondulantă.

Paramaecium se hrăneşte cu bacterii, diatomee, alge. Prin mişcarea cililor, particulele alimentare sînt îndreptate către peristom, de aici în citostom şi citofaringe. Cu ajutorul membranei ondulante particulele alimentare sînt împinse pînă la capătul citofaringelui unde se formează o vacuolă digestivă. Hrana, împreună cu o picătură de apă este inclusă în vacuola digestivă, care odată formată este antrenată de curenţii citoplasmatici, timp în care au loc, fazele digestiei. Resturile nedigerate sînt eliminate printr-un citoproct situat la capătul posterior al corpului.

În endoplasmă prezintă un macronumleu masiv granular şi un micronucleu compact situat în apropierea celui dintîi, motiv pentru care, spre deosebire de celelalte protozoare, ciliatele sînt considerate heterocariote.

Are 2 vacuole pulsatile situate la cele două extremităţi ale corpului. O vacuolă pulsatilă, este formată dintr-un rezervor central şi canalicule excretoare dispuse în rozetă, înconjurate de o plasmă nefridială, excretoare sau plasma lui Gelei. Cele 2 vacuole contractile funcţionează alternativ: cînd una se află în faza de umplere (diastola) cealaltă se

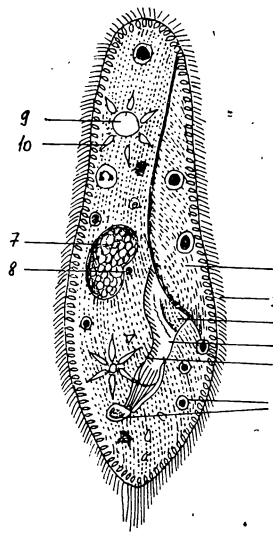


Fig. 2. Paramaecium caudatum: 1 — cili; 2 — peristom; 3 — citostom; 4 — citofaringe; 5 — membrană ondulantă; 6 — vacuole digestive; 7 — macronucleu; 8 — micronucleu; 9 — rezervorul vaculolei pulsatile; 10 — canaliculele excretoare ale vacuolei pulsatile.

află în faza de golire (sistola). Vacuolele pulsatile au rol excretor și osmoregulator.

Paramaecium (popular numit pantofior), trăiește în ape dulci, fîntîni, mlaștini, bălți etc.

1.1.1. METODE DE COLECTARE ȘI PREPARARE:

Formele libere se colectează din ape dulci, ape marine, interstiții nisipuri marine. Se colectează plantele acuatice, care au o faună bogată sau mîl de la suprafața apelor unde deseori trăiește o bogată microfaună, de exemplu alge inferioare, dintre care în special diatomee, care servesc drept hrană multor amibe.

Probele sînt aduse în borcane de sticlă, ferite de zdruncinături și schimbări bruște de temperatură, și ținute apoi în laborator în vase cu suprafața relativ mare, la temperatură de 18—22°C. Înainte de a începe cercetarea microscopică, probele sînt lăsate să stea cîtva timp liniștite, la lumină (nu însă în plin soare), spre a permite microorganismelor respective să-și facă repartiția pe zone ca în biotopul lor de origine. Curînd după așezarea lor, trebuie făcut un prim studiu faunistic, deoarece unele

forme pot dispare foarte repede. Altele, cum sînt amibele, după 2—3 zile de păstrare liniştită a probelor, sînt mai numeroase.

Protozoarele parazite se obţin din gazdele respective, prin analiza parazitologică a fiecărui organ şi produsele lor.

Studiul amibelor libere şi a celor endoparazite la animalele cu sînge rece se poate face la temperatura laboratorului. Protozoarele parazite la animalele hemeoterme mor repede dacă nu sînt ţinute la cald, fapt care necesită o instalaţie specială. Există astfel de mese de microscop, permanent încălzite prin curent de apă caldă sau prin electricitate. Mai practice sînt termostatele.

Pentru observaţii îndelungate asupra protozoarelor, în special amibe, camera umedă este neapărat necesară. În acest scop se poate întrebuinţa o lamă concavă sau una dintre cunoscutele camere Kolkwitz sau Thoma.

Pentru determinarea şi studiul biologic al Protozoarelor, culturile în vitro, sînt de un real folos. Pentru acestea ne sînt necesare vase de sticlă şi diverse materii organice, separate sau amestecate, peste care se toarnă apă fiartă şi răcită sau apă de ploaie (infuzii). Dintre infuziile în care trăiesc protozoarele. menţionăm diverse tipuri de sol, mîluri, plante uscate (fîn, paie, etc.), frunzar, muşchi, excremente etc. Culturile se păstrează în locuri calde, departe de sursa de căldură, acoperite sau lăsate libere.

Infuziile pot fi făcute şi cu soluţii hrănitoare. Astfel de soluţii (decocţi) se prepară prin fierberea diverselor substanţe organice, vegetale sau animale, de exemplu fîn, frunzar, muşchi, excremente etc. Soluţii hrănitoare se poate prepara şi prin simpla extragere sau dizolvare la rece a albuşului, gelatinei, zaharurilor, serului sanguin etc.

Speciile de protozoare care apar în cultură variază după felul materialului infuzat şi după compoziţia apei sau a soluţiei hrănitoare. După circa 14 zile ele se dezvoltă într-o succesiune care nu se respectă întotdeauna; mai întîi apar infuzori din genul *Colpoda,* hipotrichi *(Stylonychia) Paramaecium, Vorticella* şi mai tîrziu amibe.

Protozoarele din sol cresc bine pe agar dizolvat în decoct de tărînă. În soluţii ca : soluţia Ringer (clorură de sodiu 6,5 gr, clorură de potasiu 0,25 gr, clorură de calciu 0,30 gr, bicarbonat de sodiu 0,20 gr, apă distilată 1000 gr.), lapte maltozat, albuş de ou, ser fiziologic 0,30%, unele forme pot fi menţinute suficientă vreme pentru a fi studiate. Culturile mixte de protozoare libere se menţin adăugînd din timp în timp boabe mici de orez sau pudră de lăptucă.

Studiul protozoarelor pe viu se face la microscop, între lamă şi lamelă. Pentru aceasta se ia cu o pipetă o picătură dintr-o probă de apă sau infuzie şi se pune pe o lamă de sticlă. Peste picătură se aplică apoi o lamelă care poate fi unsă pe margini cu vaselină sau se parafinează, pentru a se împiedica evaporarea.

Dacă studiem forme din mare sau alte ape sărate, trebuie să evităm sporirea salinităţii prin adăugirea apei de mare, spre a compensa apa pierdută prin evaporare. În acest caz, pe sub lamelă se pipetează încetul cu încetul apă dulce, pe cît posibil bine aerată.

Pentru evidențierea incluziunilor și organitelor celulare, se recomandă coloratiile vitale cu : albastru de metil (în concentrație o parte la 500, o parte la 1.000 și o parte la 10.000 în apă distilată) pentru nucleu și organitele citoplasmice ; roșu neutru (în concentrație o parte la 1.000, o parte la 10.000 și o parte la 100.000 în apă distilată) pentru vacuole și granulele de secreție produse de aparatul Golgi ; verde Janus pentru condriom ; sudanul III pentru colorarea grăsimilor neutre.

Pentru realizarea unei coloratii vitale se procedează astfel : dintr-o soluție apoasă de colorant vital se pune pe o lamă curată și degresată o picătură care se lasă să se evapore. Pe acest loc, se pune apoi o picătură din proba sau cultura de protozoare pe care vrem s-o examinăm la microscop. În acest timp, colorantul pătrunde prin membrana celulară și colorează selectiv constituenții. De exemplu, cu roșu neutru vacuolele digestive din corpul ciliatelor (ex. Paramecium) se vor colora unele în roșu-vișiniu, altele în portocaliu. Primele sînt în faza acidă (pepsică), ultimele în faza alcalină (tripsică). Dacă se urmărește evoluția mai departe a acestor vacuole, se observă că treptat cele colorate inițial în vișiniu virează spre portocaliu, iar cele portocalii devin incolore și cu timpul dispar, prin eliminarea resturilor nedigerate.

Se mai poate utiliza și o altă metodă prin care pe marginea lamelei se pipetează colorantul vital.

Pentru efectuarea preparatelor permanente se utilizează următoarele tehnici :

1. *Tehnica frotiurilor uscate* — este metoda fundamentală pentru studiul elmentelor sîngelui și paraziților săi. Acest procedeu se bazează pe folosirea succesivă a amestecului May-Grünwald, Giemsa-Romanovschi, utilizînd metoda panoptică a lui PAPPENHEIM.

Lichidul May-Grünwald colorează mai ales elementele acidofile și granulațiile neutrofile ale leucocitelor, în timp ce soluția iGemsa-Romanovschi colorează nucleii și părțile azurofile. Separat, fiecare din ele dau o colorație incompletă.

Pentru executarea frotiurilor se iau prize de sînge sau limfă recoltate de la animale în condiții sterile. De ex. pentru efectuarea frontiurilor cu *Trypanosoma equiperdum* se infestează un animal de experiență cu o tulpină de *Trypanosoma equiperdum*. După 24—48 ore se recoltează pe o lamă, prin tăierea vîrfului cozii sau urechii, o picătură de sînge la care se adaugă o picătură de soluție clorurată izotonică. Se aplică o lamelă și se observă la microscop. Printre elementele figurate ale sîngelui se observă, în plasmă, forme heliocoidale de Trypanosoma equiperdum în mișcare. Ele se recunosc ușor după mișcările lor ondulatorii și de răsucire în jurul axului longitudinal.

Pentru executarea frotiurilor de *Leptomonas pyrrhochoris*, homolimfa, recoltată de la insecta *Pyrrhochoris apterus* (Ord. Heteroptera), prin tăierea unei antene sau a unui picior, se scurge pe o lamă într-o soluție clorurată izotonică. În picătura de hemolimfă studiată la microscop, în cazul cînd paraziții sînt prezenți, se observă o agitație permanentă datorită mișcării de bici a flagelului.

Picătura de sînge sau hemolimfă se întinde pe o lamă într-un strat subțire în felul următor :

1. se pune picătura la 1 cm de marginea îngustă a unei lame ;

2. se așează o lamă peste această picătură înclinînd-o la 45° ;

3. se așteaptă ca picătura să se întindă pe marginea lamei ;

4. de-a-lungul lamei suport se mișcă lama odată într-un singur sens ;

5. se usucă lama rapid prin agitare cu mîna sau cu un carton (nu se usucă la flacără).

Frotiurile se colorează deobicei în cutii Petri sau în cristalizatoare care trebuiesc acoperite pentru a împiedica evaporarea alcoolului metilic din soluția May-Grünwald.

1. *Fixarea :* se varsă pe frotiu 10 picături din lichidul May-Grünwald gata preparat. Se acoperă cutia Petri. Se lasă 3 minute. Este important să nu se depășească acest timp optim și să nu se usuce soluția.

2. *Colorarea :* se face în doi timpi.

Timpul 1 : se înlătură fixatorul, care în același timp este și colorant și se toarnă peste frotiu 10 picături de apă distilată, neutralizată cu carbonat de calciu. Se folosește întotdeauna un număr de picături de apă distilată egal cu numărul de picături din soluția May-Grünwald care au servit pentru fixare. Se amestecă bine lichidul, înclinînd lama în toate sensurile. Se lasă un minut.

Timpul 2 : se aruncă colorantul precedent și fără să se spele se varsă pe frotiu soluția Romanovschi-Giemsa diluată în proporție de 3 părți la 2 cc de apă distilată. În funcție de natura și vechimea frotiului se lasă 5 pînă la 30 minute sau chiar o oră. Timpul optim : 10—15 minute.

3. *Spălarea :* această operație cere precauții deosebite pentru a se evita depunerea precipitatului care se formează ca o peliculă pe suprafața frotiului. Fără să se îndepărteze colorantul se spală lama cu multă apă distilată dintr-o pisetă. Jetul puternic antrenează particulele precipitatului și pelicula superficială. Spălarea trebuie să fie rapidă.

4. *Diferențiere :* dacă colorația este foarte albastră se poate diferența printr-o spălare prelungită cu apă de robinet sau cu apă distilată.

5. *Uscarea prin scurgere.*

6. *Examinarea la microscop,* fără lamă, într-o picătură de ulei de cedru, la obiectiv cu imersie.

II. *Tehnica frotiurilor umede.* Pentru executarea acestor frotiuri se folosesc mai multe metode, printre care menționăm :

a) Pe o lamă bine degresată și curată se pune o picătură de gelatină dizolvată. Se adaugă o picătură de protozoare, se amestecă și se întinde într-un strat subțire și omogen. Lama se pune apoi pe lichidul de conservare cu fața gelatinată în jos. Gelatina coagulează protozoarele, acestea rămînînd deobicei așa de bine lipite de lamă încît pot fi fixate și colorate ;

b) Pe o lamă curată se întinde un strat subțire de emulsie proaspătă de albuș de ou în apă distilată sau albumină Mayer. Peste emulsia de albuș de ou se adaugă picătura de protozoare și se lasă 5—10 minute. Lamele acoperite de un strat omogen de albumină Mayer se plimbă deasupra flăcării unui bec Bunsen pînă ce ies aburi. Se adaugă apoi o picătură de protozoare. Datorită albuminei protozoarele aderă mai bine pe lamă.

Se trec apoi la fixare. Fixatorii cei mai folosiți sînt :

— *Sublimatul alcoolic :* soluție saturată de sublimat 2 volume ; alcool absolut un volum. Se fixează la rece sau la cald (60—70°). Acest fixator cere o spălare cu soluție Lugol (1 gr iod, 2 gr iodură de potasiu, 300 gr apă distilată) deoarece orice urmă de sublimat deteriorează preparatul.

— *Picroformol :* 1 volum formol concentrat și 3 volume apă distilată în care s-a dizolvat pînă la saturație acid picronitric. În momentul folosirii i se poate adăuga 5% acid acetic glacial. După fixare se spală în 2—3 băi de alcool 40—70%.

— *Formolul* 5%, care conservă bine mai ales amibele parazite precum și chiștii lor. Pentru a preveni uscarea materialului se poate adăuga după fixare 10% glicerină.

— *Lichidul Flemming :* 15 volume acid cromic 1%, 4 volume acid osmic, 1 volum acid acetic cristalizat.

— *Vaporii de acid osmic,* soluție 1%.

Frotiurile umede se scufundă în fixator aproximativ 10 minute sau picătura de protozoare se expune acțiunii vaporilor de acid osmic timp de 15—20 minute după care se întinde pe lamă și se usucă prin agitare.

Pentru colorare se folosește soluția Giemsa pentru frotiurile umede sau carminul boracic, carminul alunat, hemalaunul, hematoxilina ferică.

În *metoda Giemsa pentru frotiurile umede,* după fixare în sublimat alcoolic și spălare cu soluție Lugol, eliminarea iodului se face prin :

— scufundarea timp de 10 minute într-o soluție de hiposulfit de sodiu (0,5 gr la 100 cc apă distilată) ;

— spălare cu apă de robinet (5 minute) ;

— spălare rapidă cu apă distilată.

Colorarea timp de 1 oră pînă la 12 ore și chiar mai mult se face într-o soluție diluată Giemsa (1 picătură la 1 cm^3 apă distilată). Colorantul se schimbă după prima jumătate de oră, fiind înlocuit cu unul proaspăt. După o spălare rapidă cu apă distilată, urmează *deshidratarea,* pentru a elimina orice urmă de apă și alcool. Această operațiune se execută prin trecerea succesivă a preparatului prin următoarele lichide : acetonă 95 cm^3 + 5 cm^3 xilol ; acetonă 70 cm^3 + 30 cm^3 xilol ; acetonă 30 cm^3 + 70 cm^3 xilol ; xilol pur. Urmează montarea în balsam de Canada, între lamă și lamelă.

Dacă se folosește carminul boracic alcoolic, preparatul din alcool 70° se trece direct în colorant, în care se ține timp de 12—24 ore.

Se execută apoi diferențierea, pentru a se scoate surplusul de colorant care trebuie să rămînă numai pe nuclei. Ea se face cu multă atenție, sub microscop, pentru a se putea opri operația în clipa colorației optime.

Din colorant preparatele se pun în alcool 70° la care se adaugă cîteva picături de acid clorhidric concentrat.

Se spală preparatele în cîteva băi de alcool 70° și apoi se face deshidratarea trecîndu-se progresiv prin seria de alcooluri : 80°, 90°, 100°.

Transparentizarea se face în xilol, iar montarea în balsam de Canada.

Dacă colorația se face cu hemalaun sau carmin alunat, preparatele conservate, după fixare, în alcool 70° se spală în apă distilată cîteva ore (12 ore), schimbîndu-se apa de mai multe ori, după care se trec în colorant. Diferențierea în soluție de alaun de potasiu 1%.

Dacă folosim hemalaunul, după diferențiere, piesele se țin în apă de robinet pînă ce culoarea virează spre violet.

Pentru colorarea cu hematoxilină ferică, preparatele fixate se spală cu apă de robinet timp de 10—15 minute, după care se tratează cu un mordant (alaun de fier amoniacal 3%) alte 10—15 minute. După o spălare rapidă cu apă distilată, se colorează 10—15 minute cu hematoxilină ferică 1%. Se diferențiază, sub microscop, în alaun de fier 1%. Se montează, după deshidratare și transparentizare, în balsam de Canada. În urma hematoxilinei se poate întrebuința și eosina în soluție de 0,8%. Eosima se insolubilizează cu acid fosfomolibdenic 1%.

Nucleii amibelor se colorează bine în soluție apoasă, concentrată, de safranină, timp de 1—24 ore.

1.2. ÎNCRENGĂTURA SPONGIERI (SPONGIA)

Metazoare inferioare cu structură heterogenă și simetrie radiară. Nu au organe sau sisteme, ci categorii celulare. Corpul spongierilor este prevăzut cu pori și un sistem de canale prin care circulă un curent permanent de apă.

Prezintă un schelet intern, calcaros, silicios sau din fibre de spongină. Se cunosc trei tipuri fundamentale de structură : Ascon, Sycon, Leucon.

Forme în majoritate marine, o singură familie, Spongillidae, de apă dulce ; solitare sau coloniale, libere sau fixate.

Asexuat se propagă prin gemule (fam. Spongillidae) sau prin sorite (formele marine).

Tip de structură : — *Sycon raphanus* (Clasa Calcarea)
— *Spongilla lacustris* (Clasa Silicea)

Sycon raphanus (Fig. 3) spongier calcaros, marin, în formă de butoiaș, fixat de substrat. Opus discului de fixare se găsește osculul sau

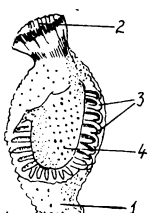


Fig. 3. Sycon raphanus : 1 — disc de fixare ; 2 — oscul : 3 — tuburi radiare ; 4 — pori inhalanți.

porul exhalant înconjurat de spiculi monaxoni. Peretele corpului prezintă numeroase tuburi sau canale radiare (care provin din invaginarea cavității corpului sau spongocelului) cu pori inhalanți.

Între tuburile radiare se găsesc canalele inhalante.

Într-o secțiune transversală prin peretele corpului, se observă :

— *stratul extern dermic*, alcătuit din celule turtite sau pinacocite ;

— *stratul intern gastric*, format din choanocite (corp celular, guleraşi citoplasmatic în care bate un flagel), cu rol în fagocitoză, care căptuşesc tuburile radiare în mare parte secţionate.

— *stratul mijlociu* sau *ectomezenchin*, în care se observă amibocitele de diferite feluri, celule sexuale, spiculi, stadii din dezvoltarea embrionară.

Corpul spongierului este permanent străbătut de un curent de apă care intră prin porii inhalanţi, apoi în tuburile radiare, scaldă choanocitele şi cavitatea corpului (atrium sau spongocel) şi iese afară prin oscul.

Fig. 4. Spongilla lacustris: colonie: 1 — oscul; 2 — pori inhalanţi.

Spongilla lacustris (Fig. 4), formă colonială, cosmopolită, comună în ape curgătoare şi bălţi, unde fie îmbracă ca un manşon diferite suporturi subacvatice fie este întinsă, ca o peliculă, pe suprafaţa diferitelor obiecte din apă. Scheletul este format din spiculi silicioşi cu un singur ax (monaxoni) care predomină la suprafaţa coloniei dîndu-i un aspect rugos. Suprafaţa corpului prezintă osculi şi pori inhalanţi.

În condiţii nefavorabile, *Spongilla lacustris* formează muguri de rezistenţă sau gemule.

1.2.1. METODE DE COLORARE ŞI PREPARARE

Spongierii de apă dulce se colectează cu suportul pe care sînt fixaţi, menţinîndu-se vii mai mult timp în acvarii.

Cei marini, se colectează cu draga, fileul sau fileul planctonic. Probele sînt triate pe viu, sub binocular.

Păstrarea spongierilor se face în stare uscată sau umedă. Indiferent de modul în care îl păstrăm, buretele trebuie să fie foarte bine spălat pentru a îndepărta substanța organică, care rămasă în ochiurile scheletului, prin descompunere, ar denatura preparatul. După spălare, se ține timp de 24 ore în spirt denaturat, conservîndu-se apoi în alcool 70° sau formol 4%.

Piesa, astfel conservată, se fixează pe o placă de sticlă legîndu-se strîns cu un fir de ață în 3—4 locuri, după care se introduce într-un borcan anatomic. Placa de sticlă, deobicei mai mică decît interiorul borcanului, este fixată, la capete, cu 2 bucăți mici de plută sau cauciuc. După fixare se toarnă lichidul conservat, alcool 70°, la care se poate adăuga 10—15% glicerină sau formol 4% cu adaos 20—25% glicerină. Se aplică capacul fără a fi fixat. Se recomandă că pînă la prepararea definitivă piesele să stea 10—15 zile, timp cînd lichidul datorită unor sedimentări se mai poate tulbura sau colora. După acest interval de timp, lichidul se scurge fiind înlocuit cu unul proaspăt. Apoi capacul este fixat definitiv folosind pasta de lipit capace, băşica de bou şi emailacul care închide porii membranei.

Pentru închiderea borcanelor de colecții se folosește următoarea pastă : 150 gr ceară de albină pură, 100 gr sacîz (colofoniu industrial), 50 gr seu de vacă topit.

Toate aceste substanțe se topesc la un loc, la foc domol, punînd mai întîi ceara, apoi colofoniul pisat. Se amestecă bine pînă se face o pastă omogenă. Se lasă apoi la răcit.

Pentru folosire, după ce se reîncălzește pasta, se unge cu o pensulă marginea superioară a borcanului, care în prealabil trebuie să fie bine uscată. Se pune la încălzit capacul borcanului pe o platină de încălzit, reşou electric, flacăra unui bec Bunsen sau lampă de spirt. Se aplică capacul care astfel încălzit va înmuia pasta de lipit şi va adera bine. După montarea şi răcirea capacului se pune deasupra o membrană din băşică de bou, care a fost ținută 24 ore în apă. Aceasta se întinde bine de jur împrejurul deschiderii borcanului şi se leagă strîns. Se lasă să se usuce ; se înlătură surplusul de membrană ; se vopsește membrana cu emailac alb sau negru.

Se pot folosi pentru montare şi chiar sînt recomandate borcanele anatomice cu dop rodat. În acest caz după ce se înțepenește dopul rodat prin răsucirea lui, se aplică pasta mai sus menționată într-un strat care să treacă atît pe dop cît şi pe borcan. După răcire se aplică membrana de bou, se leagă strîns şi se lasă la uscat. Apoi se vopsește.

Ultima operație este etichetarea borcanelor. Pe etichete se scrie numele științific al animalului, apoi cel popular, data şi localitatea unde a fost colectat, numele celui care l-a colectat şi preparat. Etichetele se aplică la partea de sus sau de jos a borcanului.

Se pot face exponate cu scheletele de spongieri. Pentru aceasta, un fragment mai mare dintr-un spongier se pune într-un cristalizator sau cutie Petri peste care se toarnă apă de Javel care are următoarea formulă :

— carbonat de sodiu — 10 gr

— hipoclorit de calciu — 5 gr
— apă distilată — 250 cc.

Se lasă cîtva timp liniştit şi apoi se agită. Apa de Javel are proprietatea de a dizolva ţesuturile, rămînînd numai scheletul care se păstrează ca atare.

Din gemule se pot face preparate definitive. Ele se pun într-un amestec de volume egale alcool 90°, glicerină şi apă distilată. Acest lichid se lasă, pentru concentrare, să se evapore lent la etuvă sau temperatura camerei, timp în care piesele ajung să fie în glicerină pură.

Se montează fie în glicerină gelatinată, fie în Faure.

Glicerina gelatinată, după Kaiser, are următoarea formulă :

— gelatină — 7 gr
— apă distilată — 42 gr
— glicerină — 50 gr
— acid fenic — 1 gr.

Se prepară astfel : gelatina tăiată cuburi, se ţine 2 ore în apă distilată pentru a se umfla. Se adaugă glicerina. Se fierbe în bainmarie. Se pune apoi acidul fenic şi se filtrează la cald prin vată de sticlă.

Pentru montare, pe o lamă curată, de sticlă, în prealabil degresată, se pune un cub de glicerină gelatină. Lama se trece apoi deasupra flăcării unui bec Bunsen sau o lampă de spirt, sau se pune pe o platină electrică pentru a se dizolva glicerina gelatinată (fără a o fierbe). Se introduce piesa şi se acoperă cu lamela în aşa fel încît să nu se formeze bule de aer, deoarece ele nu pot fi înlăturate.

Lichidul Faure este un amestec alcătuit din :

— gumă arabică — 50 gr
— chloral hidrat — 100 gr
— glicerină — 40 cm^3
— apă distilată — 100 cm^3.

Guma arabică se dizolvă în apa distilată la 80°. Se adaugă chloral hidratul şi glicerina. Se lasă timp de o săptămînă la temperatura camerei, după care se filtrează.

Pentru preparare, pe o lamă curată şi degresată, se pune o picătură din lichidul Faure. Se aşează piesa şi apoi se aplică lamela, cu grijă, pentru a nu se forma bule.

Gemulele şi spiculii se prepară prin tratare cu hidroxid de potasiu 4% (12—24 ore), deshidratarea şi montarea în balsam de Canada sau glicerină gelatinată.

Se pot executa şi preparate microscopice definitive cu secţiuni prin corpul spongierilor care se lucrează după metoda histologică. Cel mai adesea secţiunile se colorează cu hemalaun sau hematoxilină ferică.

1.3. DIVIZIUNEA CELENTERATE (COELENTERA)

Metazoare didermice sau diploblastice, cu 2 foiţe embrionare : ectoderm şi endoderm, iar între el o mezoglee. Simetria primitivă radiară, secundar bilateral sau biradiară.

Au o singură cavitate, cavitate gastrică sau enteron şi un singur orificiu homolog cu blastoporul gastrulei. Prezintă două tipuri morfologice : polipul sedentar ; meduza liberă pelagică.

Neuromiare, digestia extra și intrecelulară. Au celule urticante sau nematocisti (cnidocisti) și celule lipicoase (colloblaste). Larva ciliată planula.

Forme marine și de apă dulce, solitare sau coloniale, libere sau fixate.

Celenteratele cuprind 2 încrengături : Cnidari *(Cnidaria)*, cu nematocişti şi cele două tipuri morfologice : polip şi meduză ; ctenari *(Ctenaria)* cu colloblaste, simetrie biradiară, 8 şiruri de palete ciliate cu care se mişcă. Vom prezenta cîţiva reprezentanţi dintre cnidari.

Tip de structură : — *Hydra viridis* (Clasa Hydrozoa)
— *Aurelia aurita* (Clasa Sciphozoa)
— *Actinia equina* (Clasa Anthozoa)

Hydra viridis (hidra de apă dulce, Fig. 5), un polip solidar tipic, trăieşte în bălţi, iazuri, lacuri, ape curgătoare, fixată pe diferite plante

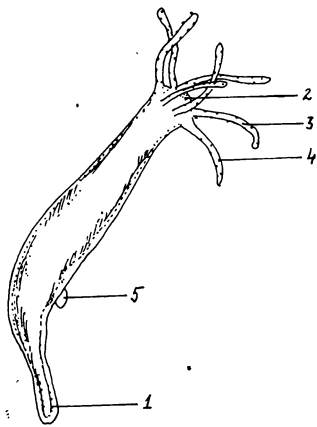


Fig. 5. Hydra viridis : 1 — disc pedios ; 2 — hipostom ; 3 — tentacule ; 4 — nematocisti ; 5 — mugure.

acvatice printr-un disc de fixare sau disc pedios. Opus acestuia, la extremitatea anterioară, pe un con bucal sau hipostom, în vîrful coloanei se găseşte orificiul bucal înconjurat de 6—10 tentacule lungi, subţiri, contractile, prevăzute cu baterii de nematocişti.

Hydra are o mare putere de înmugurire. Un mugure care apare ca o invaginare rotundă cu ectoderm şi endoderm se alungeşte rapid, îşi diferenţiază tentacule, evidenţiind astfel o hidră în miniatură. Aceşti muguri se pot detaşa de mamă sau pot rămîne împreună, dînd naştere la colonii temporare.

În condiții nefavorabile, pe suprafața corpului, apar mici mamelioane, în care se găsesc elemntele sexuale ; în cele superioare spermatozoizi, iar în cele inferioare cîte un ovul. Astfel, la hidră, pentru că polipul s-a sexuat, stadiul de meduză a dispărut.

Aurelia aurita (meduză de apă rece, Fig. 6) se găsește frecvent în Marea Neagră. Are un diametru de aproximativ 40 cm. și un regim

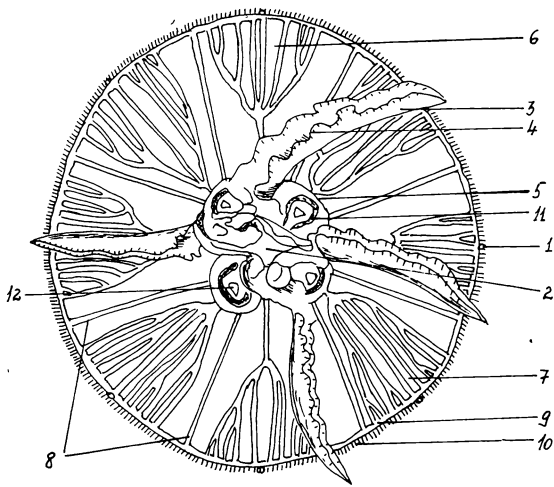


Fig. 6. Aurelia aurita : 1 — ropalie ; 2 — orificiul bucal ; 3 — braț bucal ; 4 — șanț bucal ; 5 — buzunar gastric ; 6 — canal radiar ; 7 — canal interradiar ; 8 — canal adradiar ; 9 — canal circular ; 10 — tentacule ; 11 — gonada ; 12 — orificiul camerei subgenitale.

de hrană fitofag. Fața exumbrelară convexă, cea subumbrelară concavă. Marginea umbrelei este împărțită în 8 lobi, puțin proeminenți, la rîndul lor prevăzuți cu numeroase tentacule scurte. La bifurcația lobilor se găsesc 8 ropalii, organe de simț complexe, formate dintr-un ocel celular, fosetă olfactivă, statolit. totul învelit într-un lobul protector.

Sistemul gastro-vascular, caracteristic meduzelor, începe cu orificiul bucal, de formă pătrată, care se găsește la capătul unui manubrium scurt și pătrat. Cele 4 colțuri ale gurii se prelungesc cu 4 brațe bucale lungi, pe a căror față ventrală se găsesc cîte un șanț ciliat sau șanț bucal, mărginit de 2 rînduri de franjuri bucale. Stomacul, care

urmează, se prezintă sub formă a 4 buzunare gastrice cu filamente gastrice sau facele. De la stomac pornesc : 4 canale radiare şi 4 interradiare ramificate dichotomic, 8 canale adradiare drepte neramificate. Toate aceste canale dau în canalul circular marginal, cu ramificaţii în tentacule.

Gonadele în formă de potcoavă şi în număr de 4, de culoare violet (pe viu) sau portocalie, se găsesc pe faţa ventrală a buzunarelor gastrice. Sub fiecare gonadă se găseşte cîte o cameră subgenitală cu cîte un orificiu.

Circulaţia hranei se face în sens centrifug, în canalele neramificate (adradiare) şi centripet în cele ramificate (radiare şi interradiare).

Actinia *equina* (dedițel de mare, Fig. 7) este un polip solitar, cilindric, lung de 3—4 cm, de culoare brun-roşcată. Trăieşte în Marea Neagră,

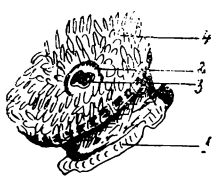


Fig. 7. Actinia equina : 1 — disc pedios ; 2 — disc bucal ; 3 — orificiul bucal ; 4 — tentacule.

fiind fixată de pietre, în zona de bătaie a valurilor, printr-un disc pedios. Opus acestuia se găseşte discul bucal, în centrul căruia se găseşte orificiul bucal care provine din invaginarea peretelui corpului. Acest orificiu reprezintă gura fiziologică sau actinostom. Gura morfologică sau hidrostom se găseşte la capătul invaginat al faringelui sau actinofaringe. Actinostomul este înconjurat de 6 cercuri contractile de tentacule. Discul bucal prezintă în jurul ultimului cerc de tentacule, tuberculi marginali prevăzuţi cu baterii de nematocişti.

Pentru evidenţierea organizaţiei interne, se taie coloana cilindrică a unei actini în plan sagital sau în două, transversal.

1.3.1. METODE DE COLECTARE, PREPARARE

Colectarea hidrozoarelor marine şi de apă dulce, reprezentate prin polip şi meduză, dar predominant este polipul, ca şi a antozoarelor, exclusiv marine, reprezentate numai prin polip, se face cu draga, filcul sau fileul planctonic.

Dintre hidrozoarele de apă dulce, animalul cel mai uşor de procurat este hidra, un polip solitar, care trăieşte în bălţi, iazuri, lacuri, fixate pe diferite plante acvatice. Se colectează în special în lunile de vară.

Probele aduse în laborator sînt puse în vase de sticlă cu apă şi la lumină. După cîtva timp cercetînd peretele vasului îndreptat către lumină vom observa numeroase hidre fixate pe acesta. Sub binocular

și cu o pipetă, se culeg hidrele care se trec apoi în sticle de ceas sau cristalizatoare, cu puțină apă. Atunci cînd își întind corpul și tentaculele se face fixarea.

Probele marine triate pe viu, sub binocular, sînt separate pe specii în sticle de ceas, cristalizatoare sau cutii Petri.

Scifomeduzele se colectează cu mîna, cu o farfurie curată, cu o strecurătoare fără asperități sau cu o plasă rară de pînză sau sîrmă. La valuri puternice sînt aruncate la mal fiind fixate pe loc în alcool 70° sau formol 4% preparat cu apă de mare.

Pentru obținerea unor preparate bune, este bine ca meduzele vii să se țină 15—20 minute (după dimensiune) într-o soluție de acid osmic 1%. Acest lichid are proprietatea de a le întări corpul păstrînd transparența țesuturilor și culoarea naturală. Urmează spălarea în cîteva băi de apă distilată și conservarea în alcool 70° sau formol 4%.

Actiniile, antozoare solitare, care trăiesc în zona de reflux (există și în Marea Neagră, deși este o mare fără flux și reflux), pe fața inferioară a stîncilor, se desprind cu ajutorul unui cuțit.

Detașate de substrat, actiniile se pun într-un vas cu apă de mare. Înaintea fixării, pentru ca tentaculele să fie bine întinse, antozoarele, solitare sau coloniale, trebuiesc anesteziate.

Anestezia se face cu: chloral hidrat, cloroform, alcool slab (40°), sulfat de magneziu, morfină, novocaină, nicotină, care se adaugă treptat, puțin cîte puțin, în vasul cu actinii vii. Se mai pot prepara lăsîndu-le în vase cu apă de mare, nemișcate, la raze solare puternice. Apa pierzînd oxigenul și încălțindu-se va aduce animalul în extensie.

Cel mai adesea anestezia se face punînd vasul cu animalele vii sub un clopot de sticlă plin cu fum de tutun. Exemplarele mici pot fi fixate fără o anestezie prealabilă.

Fixatorii cei mai folsiți sînt: sublimatul acetic (soluție apoasă saturată de sublimat — 95 cm^3; acid acetic cristalizat — 5 cm^3) la rece și la cald (50°—60°); formol concentrat (care la actinii se toarna brusc); soluție concentrată fierbinte de cloral hidrat (mai ales pentru hidre).

Dacă fixarea s-a făcut cu sublimat, atunci spălarea se execută în 2—3 băi de alcool iodat (1 picătură de tinturâ de iod în alcool 70°); în cazul fixării cu formol, spălarea se realizează în cîteva băi de apă distilată.

Conservarea hidrozoarelor se face în alcool 70° la care se poate adăuga 10% glicerină. Piesele (polipi, meduze) se pot păstra ca atare în fiole de cîntărire sau sticluțe de penicilină cu același lichid conservant, fiind etichetate, sau pot fi executate preparate definitive.

Scifozoarele se montează în borcane antomice largi și puțin înalte, folosind ca lichid conservant alcool 70° sau formol 4%. Pentru a da impresia că plutesc se pot folosi două sisteme:

1. se pune deasupra un balon de sticlă închis complet ca plutitor, fiind prevăzut cu un ochi. Un fir de ață se trece prin ochi și prin meduză, dedesubt fiind legată o baghetă mică de sticlă.

2. se așează dedesubtul meduzei un suport rotund de sticlă reprezentat prin 2 cercuri legate printr-o bară. El se obține dintr-un tub de sticlă rotunjit la flacără.

După ce se așează meduza în borcan, folosind unul din sistemele menționate mai sus, se pune lichidul conservant, apoi capacul, pasta de lipit, băşica de bou, emailacul, eticheta.

Conservarea antozoarelor, în borcane de colecție, fixate pe placă de sticlă, se face în următoarele lichide :

— amestec de părți egale alcool 70° și glicerină sau

— soluție de formalină 3% cu adaos de 15—20% glicerină.

Se închide la fel ca și celelalte preparate.

Se pot executa și preparate totale din polipi completi (autozoizi) desprinși de pe rachisul coloniei.

Pentru realizarea preparatelor definitive sînt necesare mai multe etape :

colorare : carmin boracic alcoolic — 24—48 ore.

spălare : 2—3 băi alcool 70° pînă dispare orice urmă de colorat.

diferențiere : alcool 70° în care se adaugă cîteva picături de acid clorhidric. Colorantul trebuie să rămînă numai pe nuclei.

spălare : 2—3 băi de alcool 70°.

deshidratare : alcool 80°, 90°, 100° (ultimul poate fi înlocuit cu alcool amilic sau butilic).

transparentizare : fie în creozot (2 băi de cîte 6 ore), fie în xiloi.

montare : din creozot piesele se montează în balsam de Canada, puse între lamă și lamelă, ținîndu-se apoi în etuvă la 40°, cîteva zile pentru scoaterea bulelor de aer. Dacă transparentizarea se face în xilol, atunci piesele înainte de a fi montate în balsam se trec într-o baie din-tr-un amestec de xilol și balsam.

Preparatele se etichetează. În etichetă se trece numele științific al animalului, locul și data colectării.

1.4. ÎNCRENGĂTURA PLATELMINȚI (PLATHELMINTHES)

Viermii inferiori, liberi (marini, de apă, dulce, terestri) și paraziți.

Metazoare triploblastice, la care apare cea de a treia foiță embrionară : mezoderm.

Simetria bilaterală care se instalează determină apariția unei extremități anterioare și posterioare, a unei fețe dorsale și ventrale.

Corpul turtit dorso-ventral, acoperit cu cili la formele libere (Turbellariate) sau cu cuticulă la cele parazite (Monogene, Trematode, Cestode).

Cavitatea corpului de origine blastocelină plină cu țesut mezenchimatic.

Tubul digestiv, absent la Cestode, cu un singur orificiu.

Aparatul excretor de tip protonefridian.

Sistemul nervos format din creer și cordoane medulare ventrale și dorsale (pînă la 10 perechi), cele ventrale mai puternice.

În majoritate hermafrodite, cu organe reproducătoare extrem de complicate, ovarul și glanda vitelogenă separate. Ouă ectolecite.

Tip de structură : *Dendrocoelum lactum* (Clasa Turbellaria)

Taenia solium (Clasa Cestoda)

Fasciola hepatica (Clasa Trematoda)

Dendrocoelum lactum (planaria albă, Fig. 8) este o specie comună în apele dulci curgătoare și stătătoare, din regiunile de șes.

Corpul alungit, turtit dorso-ventral, are partea anterioară trunchiată cu 4 lobi mici și un organ adeziv frontal; marginile sînt ondulante.

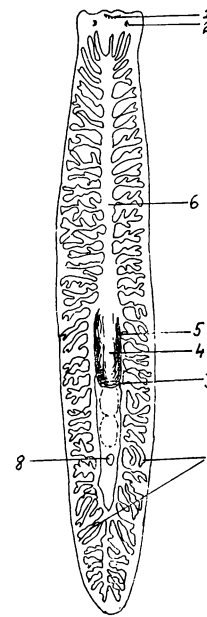


Fig. 8. Dendrocoelum lacteum: 1 — organ adeziv; 2 — ochi; 3 — orificiul bucal; 4 — faringe; 5 — teacă faringiană; 6 — ramul anterior al intestinului; 7 — ramurile posterioare ale intestinului; 8 — orificiul genital hermafrodit.

Culoare alb-lăptoasă, care contrastează cu cei 2 ochi negri mici și depărtați între ei, situați anterior și dorsal, lasă să se vadă prin transparență, pe animalul viu, tubul digestiv. Acesta începe cu orificiul bucal, situat ventral, sub mijlocul corpului. Faringele musculos care urmează este învelit într-o teacă faringiană devaginabilă. Intestinul prezintă trei ramuri (Ord. Triclade) una anterioară, 2 posterioare, la rîndul lor cu numeroase diverticule, închise orb sau în fund de sac. Nu au anus.

Între extremitatea posterioară a corpului și orificiul bucal se găsește orificiul genital hermafrodit.

Aparatul reproducător poate fi studiat pe preparate totale și secțiuni histologice seriate.

Aparatul genital mascul este reprezentat prin foliculi testiculari numeroși, repartizați în parenchim atît dorsal cît și ventral, iar cel femel prin 2 ovare situate între ramificațiile anterioare ale intestinului. Fecundația este încrucișată.

Taenia solium, lungă de 2—8 m, albă și transparentă, cu musculatură puțin dezvoltată.

Scolexul (Fig. 9) de formă globuloasă prezintă o dublă coroană de cîrlige, cu o structură complicată și 4 ventuze rotunde.

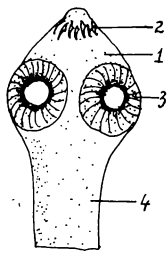


Fig. 9. Taenia solium: 1 — scolex; 2 — dublă coroană de cîrlige; 3 — ventuze; 4 — gît.

Gîtul sau zona proligeră, de 2—4 cm, mai îngustă decît scolexul, posterior prezintă striații transversale care schițează locul de diferențiere a proglotelor, al căror număr variază de la 900—2.000.

Fiecare proglot este străbătut de cordoanele nervoase longitudinale laterale, trunchiurile excretoare longitudinale laterale ultimele legate între ele, posterior, prin anastomoze transversale.

Un proglot adult (Fig. 10) arată aparatul genital mascul și femel distinct.

Aparatul genital mascul este constituit din foliculi testiculari numeroși, așezați lateral, în regiunea anterioară a proglotei. De la ei pornesc scurte canalicule eferente ce se unesc în canalul deferent sinuos, care merge în direcție transversală către una din laturile proglotului. Aici se dilată într-o pungă a cirului, conținînd cirrul (penisul) care se deschide la papila genitală, ce alternează pe una din laturi relativ regulat.

Aparatul genital femel este reprezentat prin 2 ovare inegale situate posterior în proglote. De la fiecare pornește cîte un oviduct scurt. Acestea se unesc într-un oviduct comun care ajunge într-un ootip sau răspîrtie genitală, înconjurat de glandele cochiliere sau glandele lui Mehlis, ce secretă coaja oului. La partea posterioară se găsește glanda vitelogenă, care-și varsă secrețiile tot în ootip.

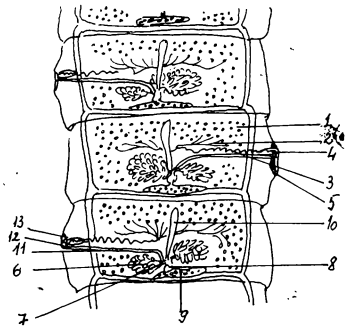


Fig. 10. — Taenia solium — proglot adult: 1 — foliculi testiculari; 2 — canalicule eferente; 3 — canal deferent; 4 — cirr; 5 — papilă genitală; 6 — ovar; 7 — oviduct; 8 — ootip; 9 — glandă vitelogenă; 10 — uter; 11 — vagin; 12 — orificiul genital femel; 13 — orificiul genital mascul.

Din ootip pornește pe de o parte vaginul, un conduct lung ce merge pe o porțiune paralel cu canalul deferent, deschizîndu-se prin orificiul femel (copulator) în papila peniană, alături de cel mascul, iar pe de altă parte uter, anterior, închis în fund de sac, la proglotele mai tinere fără sau cu puține ramificații. În proglotele bătrîne uterul plin cu ouă se ramifică puternic (7—10 ramificații dendritice de fiecare parte a trunchiului principal). Gazda definitivă este omul, unde parazitează în intestin, gazda intermediară este porcul. Larva parazitează în musculatura porcului și este cunoscută sub denumirea de *Cysticercus cellulosae*.

Fasciola hepatica (viermele de gălbează, Fig. 11) trăiește ca adult în căile biliare la ovine și bovine, producînd boala numită fascioloză (gălbează).

Are aspect de frunză sau sămînță de dovleac, puternic turtită dorsoventral.

Corpul este acoperit cu cuticulă; anterior are un rostru cu spinișori recurenți cu rol în fixare; el poartă terminal ventuza anterioară sau bucală, în mijlocul căreia se găsește orificiul bucal, de la care pornește tubul digestiv constituit dintr-un faringe musculos, un esofag scurt și 2 ramuri intestinale, ramificate secundar și închise în fund de sac. Cele 2 ramuri nu se unesc posterior.

Ventral la bifurcația ramurilor intestinale se găsește ventuza ventrală care este oarbă.

Aparatul excretor este constituit din 2 trunchiuri excretoare principale, ramificate în parenchim în canalicule fine, închise la capăt cu cîte o celulă cu flamura vibratrilă. Trunchiurile colectoare principale se curbează ventral și la o oarecare distanță de ventuză ventrală se unesc într-un trunchi excretor comun care se îndreaptă posterior. Terminal se dilată într-o veziculă excretoare și se deschide prin porul excretor (foramen caudale) la exterior.

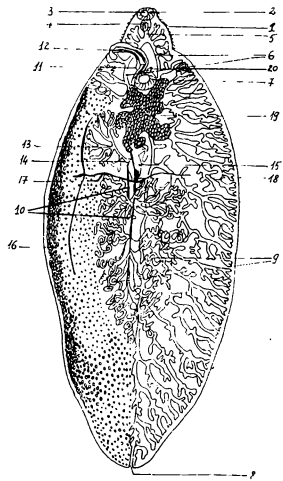


Fig. 11. Fasciola hepatica — adult: 1 — rostrum; 2 — ventuza bucală; 3 — orificiul bucal; 4 — faringe; 5 — esofag; 6 — ramuri intestinale; 7 — ventuză ventrală; 8 — foramen caudale; 9 — testicule; 10 — canale deferente; 11 — vezicula seminală; 12 — penis; 13 — ovar; 14 — oviduct; 15 — ootip; 16 — foliculi vitelini; 17 — viteloduct; 18 — rezervor vitelin; 19 — uter; 20 — orificiul genital femel.

Fascicola hepatica este un trematod hermafrodit.

Aparatul genital mascul este format dintr-o pereche de testicule ramificate, situate în jumătatea posterioară a animalului, unul înapoia celuilalt. De la ele pornesc două canale deferente ce se îndreaptă anterior și în dreptul ventuzei ventrale se unesc într-un conduct comun. Acestea se dilată într-o pungă a cirului, care conține, vezicula seminală răsucită în S, canalul ejaculator, cirul (penis) și se deschide prin orificiul genital mascul așezat deasupra ventuzei ventrale.

Aparatul genital femel este alcătuit dintr-un ovar ramificat dichotomic, situat pe partea stîngă în treimea anterioară a corpului, înaintea testiculelor. De la el pleacă un oviduct scurt ce se deschide în ootip, unde ajung și secrețiile glandelor vitelogene. Foliculii vitelini numeroși ocupă părțile laterale ale corpului; produsele lor se adună în 2 canale longitudinale colectoare sau viteloducte de la care pornesc viteloductele transversale. Ultimele fuzionează pe linie mediană și înainte de a se deschide în ootip se dilată într-un rezervor vitelin. De la ootip, înconjurat de glandele cochiliere (glandele lui Mehlis), pleacă uterul, lung, încolăcit, plin cu ouă embrionate. El se îndreaptă anterior iar la bifur-

cația intestinului se deschide prin orificiul genital femel, situat lîngă cel mascul, pe o papilă hemafrodită. Ultima porțiune a uterului funcționează și ca vagin.

1.4.1. METODE DE COLECTARE, PREPARARE

Platelmin̦ții se studiază pe viu, în preparate totale incolore sau colorate și în secțiuni histologice seriate.

Colectarea turbelariatelor se face cu fileul, luînd probe din vegetația de pe fundul bazinului și de la suprafață. Probele sînt spălate bine în fileu și introduse apoi în borcane.

Trierea se face pe viu și sub binocular.

Planariile de apă dulce care trăiesc pe partea inferioară a pietrelor sau frunzelor, printre plante, și cele terestre, de sub frunze și scoarța copacilor căzuți în păduri, unde aderă puternic, se colectează cu pensula. Formele dulcicole se transportă bine cu termosul. În laborator se pun în vase de sticlă, la un loc bine aerat și luminat, mai rar în frigider (forme stenotherme), fiind ținute timp îndelungat în cultură. Apa se schimbă zilnic. Se hrănesc cu fragmente de rîmă sau dafnii.

Planariile terestre se fixează pe loc.

Pentru colectarea Trematodelor și Cestodelor adulte este necesar să se facă examenul parazitolgic al intestinului, ficatului și altor organe parazitate de la diferite gazde.

De exemplu, trematodele parazite în tubul digestiv fiind foarte mici sînt greu de observat. De aceea se taie tubul digestiv în lungul său și se raclează mucoasa intestinală cu ajutorul unui bisturiu. Produsul se amestecă cu ser fiziologic sau cu apă în vase care se agită. Este indicat chiar pentru recoltarea diferiților helminți ca fragmentele de intestin să se spele agitîndu-se puternic în soluție fiziologică sau apă. Se analizează conținutul recoltat la un binocular, colectînd trematodele cu o pensă. Ficatul (de oaie sau bou infestat pentru recoltarea exemplarelor adulte de Fasciola hepatica) se taie de-a lungul canaliculelor biliare ; rinichii se secționează pe marginea lor convexă pînă la bazinet, iar la plămîni se observă mai întîi prezența focarelor inflamatorii sau purulente (care indică prezența ouălor la trematode și nematode), cercetîndu-se apoi parenchimul pulmonar. Paraziții colectați se pun în soluție fiziologică. Pe suprafața diferitelor organe interne se pot găsi chiști aparținînd metacercarilor.

Majoritatea stadiilor larvare ale Trematodelor se obțin disociind hepatopancreasul gasteropodelor pulmonate acuatice, după înlăturarea cochiliei. Observația pe viu a cercarilor, cu sau fără colorație vitală, este absolut necesară.

Cisticercii Cestodelor, recoltați din mușchi de porc *(Taenia solium)* sau de vacă *(Taenia saginata)* luat de la abator, se pun în bilă (fiere). Se țin la etuvă la 37° pînă își devaginează scolexul. Înainte de fixare ei se anesteziază în alcool 10° (100 cc. alcool 96° ; 865 cc. apă distilată).

Fixarea se efectuează în următoarele soluții :

— Lichidul de Beauchamp :

Alcool 96° — 6 volume

Formol 40% — 3 volume

Acid acetic glacial — 1 volum
— Sublimat acetic
— Sublimat alcoolic al lui Schaudin, la rece sau la cald
— Picroformolul lui Bouin
— Formol 4%
— Amestecul Duboscq-Bressil
— Amestecul Zenker
— Lichidul Carnoy.

Fixarea planariilor, deobicei în lichidul de Beauchamp, se execută astfel : într-un cristalizator, sau o cutie Petri, se pun 5—6 animale. Se scurge apa pînă rămîne o peliculă subțire. Cînd animalele sînt întinse se pune fixatorul, proaspăt preparat și se agită vasul. Fiecare animal, luat în parte cu 2 scobituri se întinde între două fîșii de hîrtie de filtru și se introduce apoi, așezîndu-se cruciș, într-o cutie de vată sau cutie sterilă. Se toarnă peste ele același fixator, nu însă cel folosit, ci unul preparat nou. După 12 ore se scot planariile, tot cu ajutorul scobitorilor, dintre bandaje și se lasă libere în fixator. După 24 ore, scoase din fixator, se pun în tuburi de sticlă cu alcool 70°, conservîndu-se timp îndelungat.

Pentru fixarea Trematodelor și Cestodelor se procedează în felul următor : exemplare adulte sau fragmente din lanțul de proglote se presează între 2 lame de sticlă, legînd strîns cu ață, ca să nu se desfacă, dar cu grijă, deoarece o presiune puternică poate provoca ieșirea ouălor și a conținutului intestinal. Se țin în fixator timp de 24 ore. Se conservă în alcool 70°, sau formal 5%. Cisticercii de asemenea se pot comprima între două lame. Se obțin preparate bune de Trematode și Cestode folosind ca fixator lichidul de Beauchamp.

Cercarii se fixează în lactofenol cald (părți egale de acid lactic, acid fenic, glicerină și apă distilată).

Pentru studiu piesele pot fi folosite ca atare sau pot fi preparate total. Sînt necesare următoarele operațiuni :

— *colorare :* carmin boracic alcoolic (48 ore) carmin alunat (24—48 ore).
— *diferențiere :* alcool 70° + picături de acid clorhidric.
— *spălare :* 3—3 băi alcool 70°
— *deshidratare :* alcool 80°, 96°, 100°.
— *transparentizare :* creozot, xilol.
— *Montare :* balsam de Canada.

Pentru evidențierea tubului digestiv la *Fasciola hepatica,* prin orificiul bucal, cu ajutorul unei pipete Pasteur, se introduce o soluție de gelatină cu tuș.

Soluția de gelatină se prepara astfel : o foaie de gelatină tăiată mărunt se ține două ore în 200 cc apă distilată pentru a se umfla. Se fierbe. Se filtrează la cald. Se lasă să se răcească și apoi se adaugă cîteva picături de tuș.

La *Cestode,* după fixare urmează clarificarea cu acid lactic care are proprietatea de a scoate calciul. Se efectuează spălarea în 2—3 băi apă distilată și apoi colorarea.

Se mai poate monta și în glicerină gelatinată. De aceea din lichidul de conservare piesele se spală în cîteva băi de apă distilată. Se trec în continuare într-un amestec de alcool 70° și glicerină în părți egale, apoi glicerină pură. Se clarifică în lactofenol și se montează.

În cazul în care vrem să preparăm exemplare necolorate, atunci din alcool 70°, animalele se trec prin seria de alcooluri și creozot sau xilol și se montează în balsam de Canada. Cercarii se păstrează în lactofenol gomat între lamă și lamelă.

La Turbelariate sînt necesare și secțiuni histologice seriate colorate cu hematoxilină ferică eosină sau eritozină ca și în hemalaun-eritrozină.

1.5. ÎNCRENGĂTURA NEMERTIENI

Grup specializat. Predominant cuprinde forme marine și bentonice. Întîlnim însă și reprezentanți de apă dulce și terestri. În mod excepțional paraziți.

Tubul digestiv complet. Trompă înarmată sau nu cu stileți. Intestinul cu cecuri metamerice. Aparatul circulator închis.

1.5.1. METODE DE COLECTARE, PREPARARE

Observația pe viu este absolut necesară pentru studiul nemertienilor. Ea este completă prin examinarea preparatelor totale și a secțiunilor histologice.

Colectarea. Nemertienii se colectează greu întregi din cauza lungimii și fragilității lor. Colectarea se face cu draga, fileul sau fileul planctonic. Se mai pot colecta și plante acvatice care adăpostesc o faună bogată.

Trierea probelor se face la binocular pe cît posibil pe viu, făcîndu-se observații în special asupra formei capului și culorii animalului. Pentru evidențierea unor particularități anatomice se folosește colorație vitală cu albastru de metil.

Fixarea se face în :

— sublimat acetic, la cald

— picroformol acetic

— formol 4%

— lichidul lui Petrunkewitch (sublimat dizolvat la saturație în 300 cc apă distilată ; 200 cc alcool 95° ; 90 cc acid acetic cristalizabil ; 10 cc acid azotic pur). Se fixează timp de 12—24 ore.

Înaintea fixării, pentru a fi în extensie, nemertienii se anestesiază în apă de mare cu :

— 0,1% chloral hidrat

— 1—2% cocaină

— clorură de magneziu, adăugată picătură cu picătură pînă cînd animalele se întind bine.

Se clarifică în glicerină sau lactofenol și se montează în glicerină gelatinată sau balsam de Canada cu sau fără o colorație prealabilă cu carmin clorhidric sau acetic.

Pentru efectuarea secțiunilor histologice, este necesară o refixare în Bouin cu 2% acetat de lantan sau Bouin-mercuric. Se colorează în special cu hematoxilină ferică eosină sau eritrozină.

1.6. ÎNCRENGĂTURA NEMATELMINIȚI (NEMATHELMINTHES)

Grup heterogen. După unii autori cuprinde trei clase, după alții șase, incluzînd aici și *Trochelminții.*

Clasa reprezentativă este cea a Nematodelor, cea mai bogată în reprezentanți.

Corpul cilindric sau fuziform este acoperit de o cuticulă groasă care obligă la năpîrliri. Ciliatura restrînsă sau absentă. Cavitatea corpului este un pseudocel spațios. Tubul dgiestiv, atunci cînd există, are 2 orificii : gură și anus.

Sistemul nervos central are ganglioni asociați în jurul unui inel periesofagian.

Aparatul excretor adesea reprezentat printr-o protonefridie, uneori absentă, poate fi de un tip special (2 tuburi exrectoare în formă de H).

Sistemul circular și respirator lipsesc.

Sexe separate, rar hermafrodite.

Caracteristică este constanța numărului de celule.

Forme libere : marine, de apă dulce, terestre *(Gastrotrichi, Rotiferi, Kinorhynchi,* unele *Nematode,* adulții de *Nematomorphe)* și parazite la plante și animale *(Nematode,* larvele *Nematomorphelor, Acanthocephali).*

Tip de structură : Ascaris suum (Clasa Nematoda)

Morfologie externă.

Femela (Fig. 12 a) măsoară 25—30 cm lungime, un diametru de 5—6 mm și este ascuțită la ambele capete. Privind cu o lupă partea anterioară se observă orificiul bucal înconjurat de 3 buze : una mediană dorsală și 2 latero-ventrale. Posterior, subterminal și ventral este orificiul anal. Prin transparența cuticulei se văd liniile longitudinale, care sînt îngroșări ale hipodermului sincitial. Liniile longitudinale laterale sînt mai groase și mai evidente. În treimea anterioară se observă o mică strangulare, ca o centură, în care ventral, pe linie mediană, se află orificiul genital femel sau orificiul vulvar. Înaintea acestui orificiu este situat orificiul excretor.

Masculul (Fig. 12 b) mai mic, aproximativ 15—18 cm lungime și mai subțire (3—4 mm diametru), are capătul posterior răsucit ventral ca o spirală (cîrlje). Subterminal ventral, se observă orificiul cloacal, din care pot ieși 2 spiculi copulatori, fini, ușor curbați, egali ca lungime.

Disecția se face sub apă. Este de preferat să se folosească exemplare care au stat aproximativ 24 ore în formol 4% pentru întărirea cuticulei.

Într-un castron de disecție (tapetat cu smoală sau parafină) se fixează animalul cu fața dorsală în sus și se acoperă cu apă. Determinarea părții dorsale se face după caracteristicile morfologice ale celor 2 sexe indicate mai sus și anume : orificiul genital și anusul pentru

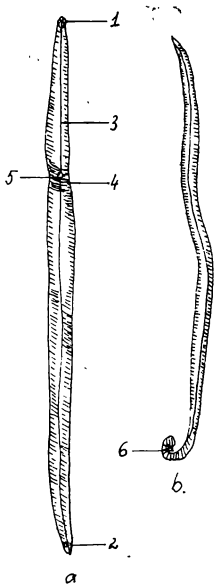


Fig. 12. Ascaris suum — morfologie externă : a) femelă ; b) mascul : 1 — buze ; 2 — orificiul anal ; 3 — linie mediană ventrală ; 4 — centura ; 5 — orificiul vulvar ; 6 — spiculi copulatori.

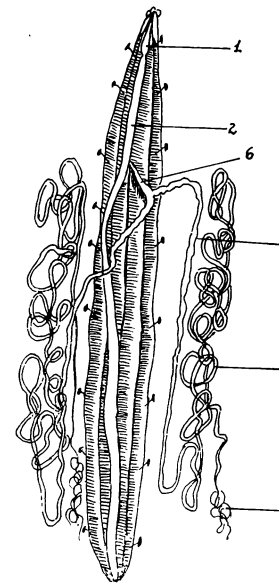


Fig. 13. Ascaris suum — disecție la femelă : 1 — faringe ; 2 — intestin ; 3 — ovar ; 4 — oviduct ; 5 — uter ; 6 vagin.

femelă, situate ventral, latura convexă a cîrjei, pentru mascul, indicînd fața ventrală.

Se așează, deci animalul cu fața dorsală în sus și se fixează anterior și posterior cu ace de gămălie. Cu ajutorul unui ac spatulat sau ac de disecție sau cu o foarfecă fină se face o incizie pe linia mediană dorsală, cu atenție, fără a pătrunde prea adînc. Pe măsură ce înaintăm cu disecția, pornind de la extremitatea anterioară către cea posterioară cu ajutorul

unei pense se refrîng pereții corpului, fixîndu-i din loc în loc cu ace de gămălie.

După terminarea acestei operații se observă organizația internă și anume tubul digestiv și aparatul genital. În linii generale, organizația celor două sexe seamănă, diferențele ținînd de aparatul genital.

Femela (Fig. 13). *Tubul digestiv* începe cu orificiul bucal înconjurat de cele 3 buze. Urmează un faringe ectodermic, musculos și aspirator,

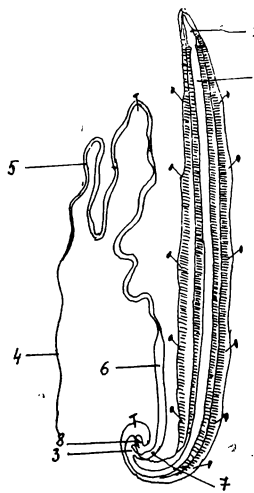


Fig. 14. Ascaris suum — disecția la mascul : 1 — faringe ; 2 —intestin ; 3 — cloacă ; 4 — testicul ; 5 — canal deferent ; 6 — vezicula seminală ; 7 — canal ejaculator ; 8 — spiculi copulatori.

de culoare albicioasă și cu lumen triunghiular în secțiune transversală, apoi intestinul, de origine ectodermică și de culoare galben-verzuie, turtit dorso-ventral. Acesta se termină posterior prin orificiul anal, subterminal, ventral.

Aparatul genital trebuie etalat cu multă răbdare, pentru că cele 2 tuburi, inegale ca diametru pe lungimea lor și încolăcite, ocupă aproape toată cavitatea corpului.

El este constituit (Fig. 13) dintr-o pereche de ovare lungi, filiforme, cu extremitatea distală extrem de fină.

Ele se continuă cu două oviducte, care dau în 2 utere cu numeroase strangulații și cu o direcție postero-anterioară. Cele 2 utere se

unesc într-un uter comun scurt și dilatat, la rîndul său în comunicare cu vaginul scurt și îngust care se deschide prin orificiul genital femel pe linia mediană ventrală.

Masculul (Fig. 14). *Tubul digestiv*, în regiunea anterioară și mijlocie, este foarte asemănător cu cel de la femelă. Regiunea posterioară prezintă o dilatare sau cloacă ano-uro-genitală.

Aparatul genital este tubular, impar, format dintr-un testicul, cu extremitatea distală foarte fină, continuat cu un canal deferent, vezicula seminală, canalul ejaculator ce se deschide ventral în cloacă. În cloacă proemin eză 2 spiculi copulatori, dilatatorii vulvei.

Aparatul genital atît la mascult cît și la femelă, contrastează cu intestinul prin culoarea alb-lăptoasă, mai accentuată la uter și vezicula seminală.

1.6.1. METODE DE COLECTARE, PREPARARE

Colectarea formelor libere se face cu draga, fileul sau fielul planctonic.

De ex.: Rotiferii plactonici se prind cu filee planctonice dese, iar reziduil filtrat se pune în eprubete, pahare sau într-o sticlă de termos, cu apă, dacă este cald afară. Se lasă la întuneric cîteva ore, timp în care rotiferii se adună la capacul vasului și pot fi ușori pipetați.

Probe de nisip luate cu bodengreiferul sau cu draga mică se spală bine cu apă filtrată din același mediu. În filtrat apar imediat unele forme care se separă. Apoi proba se pune într-un vas de sticlă sau acvariu, acoperit cu un strat subțire de apă proaspătă, într-un loc umbrit. În decurs de 24 ore, rotiferii și gastrotrichii se adună la marginea zonei de nisip și apă în partea mai luminoasă și pot fi pipetați. Proba se lasă în continuare, în aceleași condiții, cîteva zile sau chiar săptămîni. Stratul de nisip sau detritus care se formează se pipetează cu grijă. De asemenea, dacă apar în nisip pești sau alte animale acestea trebuiesc îndepărtate, pentru că alterarea lor denaturează mediul.

În fiecare zi se pipetează stratul de nisip superior și se cercetează la microscop. Astfel, în această perioadă se vor identifica toate speciile care trăiesc în nisip *(Gastrotrichi, Kinorhynchi, Nematode)*.

Pentru Gastrotrichii și Nematodele care trăiesc în apele freatice litorale metoda cea mai bună de colectare este săparea unei gropi mici în regiunea țărmului. După ce în groapă se adună mai multă apă, aceasta trebuie să fie filtrată printr-o sită planctonică în așa fel încît să se antreneze și particulele superioare ale fundului gropii.

Se mai obțin diferite specii de *Rotiferi, Gastrotrichi, Nematode*, spălînd printr-o sită deasă vegetația de fund din apa dulce sau marină, mușchi, etc. Totul se filtrează printr-o sită mai rară pentru reținerea resturilor de plante. Apa mai curată este filtrată apoi prin fileul planctonic și rezidul trebuie cercetat cît mai curînd.

Nematodele parazite se obțin spălînd bine intestinul sau alte organe parazitate în soluție fiziologică sau prin analiza parazitolgică a materiilor fecale.

Triajul prin decantare este adesea folosit. De fiecare dată se lasă să sedimenteze 5—6 minute. Acest procedeu este foarte rapid, permiţînd recoltarea tuturor speciilor în decurs de 15—20 minute. Se ţin în soluţie fiziologică.

Materiile fecale, sînt cercetate cu ochiul liber sau cu o lupă de mînă într-un vas cu pereţii puţin înalţi cu fundul plat, sub care se aşează de obicei un fond jumătate alb, jumătate negru. Dacă produsele sînt prea consistente se diluează cu o cantitate mică de soluţie clorurată izotonică sau ser de mamifer în diluţie de 1/20. La acest examen se pot distinge : fragmente de paraziţi sau chiar paraziţi întregi (ascarizi, oxiuri), sau alte produse : membrane mucoide, produse nedigerate, striuri sanguine, care trebuiesc analizate separat şi în care se pot găsi elemente parazitare. Examenul microscopic al materiilor fecale se face apoi prin metode directe (examenul direct între lamă şi lamelă, examenul direct cu soluţie clorurată şi izotonică, proba cu eosină şi cea cu Lugol) şi metode de concentrare (metoda hidrostatică Willis-Hung, metoda Telleman-Langeron, metoda de concentrare Rivas cu acid acetic).

Preparate bune de *Trichină* se obţin comprimînd între 2 lame fragmente de muşchi (de preferinţă diafragmă), la care se adaugă puţin acid acetic diluat. Lamele se leagă strîns cu aţă şi se scufundă în fixator.

Adulţii de *Acanthocephali* se colectează din tubul digestiv al vertebratelor parazitate. Pentru aceasta se taie tubul digestiv în lungul său şi se observă prezenţa paraziţilor fie cu ochiul liber fie cu o lupă de mînă. Se colectează, debarasînd trompa de ţesutul înconjurător. Se ţin în soluţie fiziologică.

Larvele de Gordioide *(Nematomorphe)* se obţin crescînd şiraguri de ouă în acvarii sau examinînd prin transparenţă larve de insecte *(Ephemere, Chironomide),* iar cele de *Acanthocephali* şi *Nectonematide (Nematomorphe)* prin prospectarea cavităţii corpului Crustaceilor.

Studiul pe viu, sub microscop, între lamă şi lamelă, este absolut necesar pentru Nemathelminţi, deoarece se notează forma corpului, mişcările, aparatul rotator, forma aparatului bucal, etc. Se adaugă coloranţi vitali ca : roşu Congo, albastru de metil, roşu neutru, soluţie de eozină, etc.

Pentru împiedicarea contractării în timpul observaţiei sau pentru încetinirea mişcărilor se folosesc o serie de substanţe ca : cocaina 1%, clorhidrat, alcool 5% *(Gastrotrichii* de apă dulce, *Rotiferi),* novocaină, cloretan, tinctură de opium, acid carbonic, vapori de alcol sau apă clocotită *(Rotiferi).* Acestea se adaugă în cantităţi mici, picătură cu picătură, pe lamă în timpul observării. La speciile marine este necesar a i se adăuga soluţiei de anesteziere puţină formalină în concentraţie de 0,1% prin care se obţine o extensie bună. Pentru Nematodele libere se utliizează glicerina foarte diluată care împiedică încreţirea cuticulei.

Fixarea se face în următoarele soluţii :

— formol 2—4% (Nematode libere)
— formol 4% (Gastrotrichi de apă dulce)
— formol 10% (Rotiferi)
— acid osmic 1% (Rotiferi, Gastrotrichi, Kinorhynchi)
— sublimat (Gastrotrichi)
— alcool 70° fierbinte (Nematode parazite, Acanthocephali).

În cazul în care este necesară tratarea probei cu formol la locul colectării (ex. *Rotiferi*), atunci anestezia se face cu lichidul lui Rousselet (10 cc alcool metilic pur, 10 cc apă de probă și 1 g clorhidrat de cocaină), din care se toarnă 1—3 picături la fiecare cc de filtrat (20 cc filtrat, 1 cc amestec). După circa 10 minute se mai adaugă 1 cc amestec sub formă de picături, după care se fixează în formol 10% sau acid osmic 1%. Rotiferii cu lorică sînt tratați direct cu formol.

Se clarifică în glicerină, acid lactic, chlorhidrat sau lactofenol.

Se conservă în alcool 70°, formol 2—4%, formol 5%, formol 10%.

Se montează, pentru executarea preparatelor totale, în glicerină gelatinată sau balsam de Canada cu sau fără colorare cu carmin clorhidric sau acetic.

Pentru secțiuni histologice se folosesc următorii fixatori :

— Lichidul Flemming
— lichidul lui Petrunkewich
— Bouin alcoolic
— sublimat alcoolo-acetic
— amestecul fixator al lui Beauchamp (1 cc acid osmic 1%, 1 cc soluție bicromat de potasiu 5%, o picătură acid acetic) sau o soluție formată din 4 cc acid osmic 1%, 1 cc sublimat soluție apoasă saturată și 5 cc bicromat de potasiu 5%.

Fixarea se face timp de 5—15 minute, după care se spală de cîteva ori cu apă distilată sau cu sublimat cald. Pentru a evita încrețirea cuticulei se practică incluzia în celoidină-parafină. Colorația după tehnicile cunoscute.

Pentru microfilariile din sînge, după studiul pe viu, între lamă și lamelă, se aplică tehnicile histologice.

1.7. ÎNCRENGĂTURA MOLUȘTE (MOLLUCA)

Protostomieni oligomeri, cu simetrie bilaterală (excepție Gasteropodele asimetrice) și corp nesegmentat împărțit în cap, masă viscerală dorsală și picior ventral. Masa viscerală este acoperită de manta (pallium) care secretă cochilia calcaroasă. Mantaua delimitează cavitatea paleală, situată posterior, unde se găsesc branchiile.

Sistemul nervos ganglionar ; perechile de ganglioni corespund principalelor organe ale corpului.

Aparatul circulator lacunar.

Tubul digestiv cu glande anexe și radulă.

Organele excretoare reprezentate prin metanefridii modificate.

În general sexe separate.

Populează toate mediile : marin, apă dulce, mediul terestru.

Tip de structură :

— *Helix pomatias* (Clasa Gasteropoda)
— *Anodonta cygnea* (Clasa Lamellibranchiata).

Helix pomatias (melcul de livadă)

Disecție. Pentru disecție animalele trebuiesc proaspăt omorîte și cît mai puțin contractate. De aceea cu 24—48 ore înainte de disecție, într-un vas înalt, cu fund plat, se pune apă fierbinte și răcită. Se introduc melcii și se aplică apoi peste vas o placă de sticlă în așa fel că nu

se formeze bule de aer. În căutarea oxigenului, gasteropodele ies din cochilie și mor asfixiate în stare de extensie.

Pentru studiul organizației interne, mai întîi trebuie să îndepărtăm cochilia. Pentru aceasta, se taie cu foarfeca cochilia de-a lungul turelor de spiră pe linia de sutură, începînd de la peristom pînă la apex. Cu o mișcare de desrăsucire a columelei, cu grijă pentru a nu strivi masa viscerală, se înlătură cochilia în întregime.

Odată îndepărtată cochilia, corpul melcului se deschide aplicîndu-i următoarele incizii :

— prima se face de la pneumostom, de-a lungul brîului mantalei, puțin deasupra lui.

— a doua se face prin spatele ultimului tur de spiră al masei viscerale mergînd către hepatopancreas și organul lui Bojamus, pînă la capătul superior al acestuia. Cu ace de gămălie se fixează capul și extremitatea posterioară a corpului, se răsfrînge și se prinde în ace mantaua care formează plafonul cavității paleale (Fig. 15).

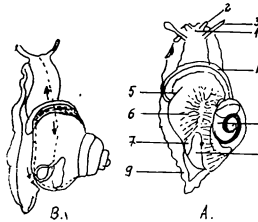


Fig. 15. Helix pomatias : A — corpul scos din cochilie ; B — liniile de incizie pentru disecție : 1 — cap : 2 — tentacule mici ; 3 — tentacule mari ; 4 — brîul mantalei ; 5 — manta ; 6 — plămîn ; 7 — inima ; 8 — organul lui Bojanus ; 9 — picior ; 10 — hepatopancreas.

— a treia incizie se efectuează pornind din mijlocul brîului mantalei, tăind tegumentul de pe partea dorsală a piciorului pe linie mediană, pînă la extremitatea anterioară a corpului. Pereții inciziei se prind în ace de parafina cuvetei de disecție. Disecția se execută sub apă, care trebuie schimbată des.

Se studiază aparatul respirator, circulator, excretor, aparatul genital care se etalează pe dreapta animalului, tubul digestiv pe stînga și sistemul nervos (Fig. 16).

Aparatul respirator. Porțiunea de manta, răsfrîntă pe dreapta, de la primele două incizii este puternic vascularizată, fiind străbătută de numeroase vase de sînge. Ea reprezintă plămînul, care comunică cu exteriorul prin pneumostom.

Aparatul circulator. Pe marginea stîngă a plămînului, înaintea organului lui Bojanus, se găsește inima asimetrică, învelită în pericard și alcătuită dintr-un auricul anterior, mic și în ventricul musculos, posterior. De la ventricul, prin aortă, sîngele este dus la organe, iar rețeaua vasculară a plămînului este legată de auricul prin vena pulmonară.

Aparatul excretor. Organul lui Bojanus, unic, un sac cu o structură mai mult sau mai puțin buretoasă, este situat în urma plămînului, între

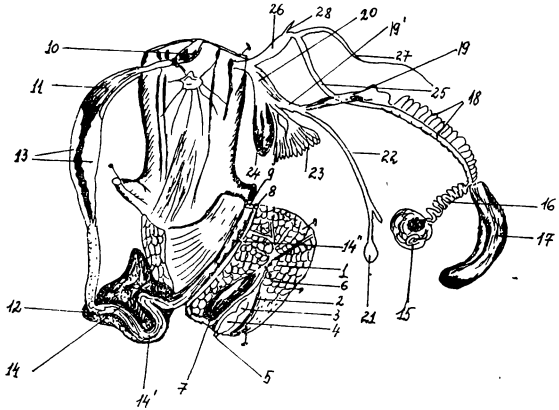


Fig. 16. Helix pomatias — disecția : 1 — plămîn ; 2 — pericard ; 3 — auricul ; 4 — ventricul ; 5 — aortă ; 6 — vena pulmonară ; 7 — organul lui Bojanus ; 8 — orificiul excretor ; 9 — orificiul anal ; 10 — bulb faringian ; 11 — esofag ; 12 — stomac ; 13 — glande salivare ; 14 — hepatopancreas ; 14′ — intestin ; 14″ — rectum ; 15 — glanda hermafroditǎ ; 16 — conductul glandei hermafrodite ; 17 — glanda albuminiparǎ ; 18 — ovospermiduct ; 19 — oviduct ; 19′ — vagin ; 20 — cloac genital ; 21 — receptacul seminal ; 22 — canalul receptacului seminal ; 23 — glande multifide ; 24 — punga dardului ; 25 — canalul deferent ; 26 — penis ; 27 — flagelul penisului ; 28 — mușchi retractor al penisului.

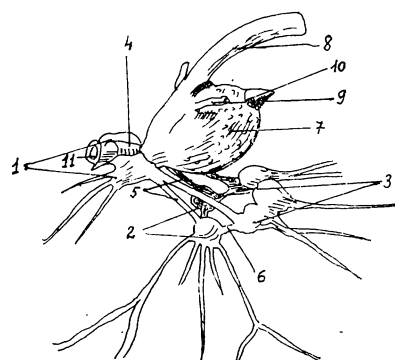


Fig. 17. Helix pomatias — sistemul nervos central : 1 — ganglioni cerebroizi ; 2 — ganglioni pedioși ; 3 — ganglioni viscerali ; 4 — comisură cerebroidă ; 5 — conective cerebro-pedioase ; 6 — conective viscero-pedioase ; 7 — bulb faringian ; 8 — esofag ; 9 — conductul glandei salivare ; 10 — sac radular ; 11 — orificiul bucal.

inimă și rect. De la pericard pleacă rinichiul al căror conduct, în partea anterioară, se îngustează mereu, constituind ureterul primar. Aceasta se curbează pe lîngă rinichi (Fig. 16), apoi se îndoaie, meage paralel cu rectul formînd ureterul secundar, care se deschide prin orificiul excretor situat pe partea internă a pneumostomului, în imediata vecinătate a anusului.

Aparatul digestiv. În evidențierea și etalarea tubului digestiv pe partea stîngă a disecției, o atenție deosebită trebuie acordată detașării intestinului de hepatopancreas, deoarece ansele lui sînt săpate în lobul mare al acestei glande digestive.

Tubul digestiv, începe cu orificiul bucal situat anterior și ventral. De la el pornește faringele care se dilată într-un bulb faringian musculos, pe al cărui planșeu este situată radula. Privită la microscop radula este formată din numeroși dințișori chitinoși, dispuși în șiruri longitudinale și transversale. Ea este mișcată de o musculatură bogată. Posteroventral bulbul farigian poartă un pinten, care corespunde sacului radular, în care se formează dinți radulari de înlocuire. Urmează esofagul, apoi stomacul fuziform, voluminos. De o parte și de alta a lui, lipită de pereții săi, se găsește cîte o pereche de glande salivare, alungite, albicioase, ale căror conducte lungi se deschid în bulbul faringian, la limita cu esofagul.

Intestinul, un tub lung, după ce face mai multe circumvoluțiuni, îndreptîndu-se anterior, se termină cu o porțiune mai groasă, rectum, care străbate cavitatea paleală și se deschid prin anus pe fața internă a pneumostomului.

Hepatopancreasul, glanda anexă a tubului digestiv, este situat în primele ture de spiră ale masei viscerale și apare ca o masă sfărîmicioasă, de culoare brună. La limita dintre intenstinul mediu și posterior se deschid 2 lobi asimetrici ai hepatopancreasului.

Aparatul genital (Fig. 16). Detașarea aparatului genital, pe partea dreaptă a disecției, trebuie făcută cu precauție pentru a nu deteriora diferitele părți constitutive, mai ales receptaculul seminal din vecinătatea cavității paleale, glanda albuminipară friabilă și gonada hermafrodită sau ovotestis, situată în mijlocul spiralei viscerale, fiind îngropată în hepatopancreas.

Aparatul genital este constituit dintr-un ovotestis, cu rol ovogen și spermigen. De la el pornește canalul glandei hermafrodite foarte fin și sinuos. Înainte de a se diferenția în ovospermiduct, conductul hermafrodit trece pe la baza glandei albuminipare, de culoare albicioasă. Din punctul în care se întîlnește cu această glandă, ovospermiductul se dilată mult și se împarte în două canale cu un diametru diferit : oviductul, larg, cu pereții plisați și canalul deferent, mult mai îngust și drept.

După ce merg o porțiune paralele între ele, cele 2 canale se separă. Astfel, oviductul devenit liber, se lărgește într-o porțiune numită vagin, după care îngroșîndu-se puțin în porțiunea sa terminală și constituind cloacul genital, se deschide la exterior prin orificiul genital comun, situat anterior și lateral, la baza tentaculului mare drept. În vagin se deschide canalul receptaculului seminal, iar în cloacul genital o pereche

de glande multifide, a căror secreție formează coaja oului, și punga dardului sau sacul săgeții, în care se află dardul sau săgeata, un organ calcar lung de aproximativ 1 cm, ascuțit, cu rol excitant.

Canalul deferent sau spermiductul este mai lung și trece sub retractorul tentaculului mare drept, după care se diferențiază într-un penis musculos. La baza lui se găsește flagelul penisului cu rol în formarea spermatoforului și un mușchi retractor prins de peretele stîng al corpului. Penisul se deschide în cloacul genital.

Sistemul nervos (Fig. 17). Situat anterior și condensat, sistemul nervos este format dintr-o masă supraesofagiană care reprezintă ganglionii cerebroizi și o masă subesofagiană în care sînt contopiți ganglionii pleurali, parietali, viscerali și pedioși. Conective cerebropleurale și cerebropedioase leagă masa cerebroidă de cea subesofagiană, de la care pleacă nervi, la cap și corp.

După etalarea organelor, contrastînd cu restul corpului prin strălucirea sidefie, se observă mușchiul columelar, răsfirat în picior.

Fixarea : alcool 70° sau formol 4%.

Montarea : pe placă de sticlă, legînd strîns în mai multe locuri cu un fir de ață. Se introduce în borcanul de colecție, fixînd capetele plăcii cu dopuri de plută sau cauciuc și se toarnă lichidul conservant : alcool 70° sau formol 4%. Se pune apoi capacul, pasta de lipit, bășica de bou, emailacul, eticheta.

Anodonta cygnea (scoica de lac)

Disecție : În mod obișnuit, pentru disecție, animalele sînt omorîte în apă încălzită la 60° în care sînt ținute pînă cînd dintre valve apare piciorul. Înainte de a fi omorîte, prin metoda ținerii în apă caldă, ele pot fi în prealabil anesteziate, timp de 24 ore, într-o soluție de 1% chloral hidrat.

Pentru studierea complexului paleal și a organelor și sistemelor cuprinse în masa viscerală, trebuie îndepărtată cochilia. Pentru aceasta, introducem între valve, dar nu prea adînc, în regiunea ventrală, lama unui bisturiu. Se taie apoi unul din mușchii adductori, după care se desprinde mantaua de pe cele două valve pe toată întinderea sa pînă la nivelul celuilalt adductor, pe care deasemenea îl tăiem. Făcînd această operație pentru ambele valve, eliberăm complet cochilia de corpul scoicii, care rămîne îmbrăcat în întregime de cele 2 foi pe care le-am desprins de pe valve. Aceștia sînt cei 2 lobi ai mantalei, prinși de corp în partea dorsală a lui. Corpul scoicii se așează într-un castron de disecție, turnîndu-se apă rece suficientă pentru a-l acoperi în întregime.

Se observă astfel că la extremitatea posterioară, pe partea dorsală, mantaua prezintă, între cei doi lobi ai săi, 2 orificii, unul dorsal, mai îngust, sifonul cloacal și altul mai jos, mai larg, sifonul branchial. Marginile amboor sifoane sînt papilate, însă la cel branchial papilațiile sînt mult mai pronunțate.

Sub țiținâ și de-a lungul ei mantaua este subțiată și transparentă pe o porțiune mai mare prin care se vede în interiorul corpului o cavi-

tate largă, pericardul (rest celomic). În fața lui, se observă hepatopancreasul, sub forma unei mase galben-verzui.

Cu ajutorul unui ac de disecție se rupe mantaua și pericardul, observîndu-se, în disecție proaspătă, inima cum bate ritmic. Ea este formată dintr-un ventricul musculos, de culoare potrocalie și 2 auricule cu pereții musculoși, foarte subțiri în formă de evantai.

Pentru studiul aparatului circulator se descoperă inima printr-un orificiu executat dorsal în cochilie. Se injectează apoi inima cu o substanță colorată, care antrenată de torentul sanguin este împinsă în vase pe care le colorează. Se evidențiază, astfel, cele 2 aorte care pleacă din ventricul :

— *aorta anterioară*, care dă ramuri la intestin, ficat, glanda genitală, organe excretoare, regiunea anterioară a mantalei.

— *aorta posterioară*, cu ramuri la rect, inimă, mușchiul adductor posterior, regiunea posterioară și ventrală a mantalei, sifoane.

Paralel cu intestinul și sub el, lateral și ventral față de pericard, se observă un tub de culoare brun cenușie, *organul lui Bojanus*. Aceste organe perechi, metanefridii modificate, au funcții excretoare. Ele cu un capăt se deschid în pericard iar cu celălalt capăt, prin orificiul excretor, în cavitatea paleală.

Pentru studiul organelor din complexul paleal se așează animalul cu fața ventrală în sus, îndepărtîndu-se cei doi lobi ai mantalei care delimitează *cavitatea mantalei* sau *cavitatea paleală*. Marginea mantalei are o musculatură ce formează un tiv care este prins din loc în loc cu ace de disecție.

În cavitatea complexului paleal (Fig. 18) intră : o pereche de branchii fixate de corp prin marginea lor dorsală, cea ventrală fiind liberă, branchiile atîrnînd în cavitatea paleală. Fiecare branchie este formată din 2 foițe sau lamele branchiale : una internă, alta externă. Aceste lamele se întind pînă la partea posterioară a corpului și prezintă striații transversale rare și striații longitudinale dese, formînd astfel o rețea străbătută de pori branchiali. În perioada de reproducere, la femelă foița branchială externă este mult umflată și de culoare brun-cafenie, fiind plină fie cu ouă fie cu larve numite *glochidium* (larva secundar adaptată a Unionidelor). Privită la microscop, între lamă și lamelă, această larvă are o cochilie embrionară formată din 2 valve, un mușchi adductor, precum și 2 pliuri puternice care se extind și căptușesc cochilia, reprezentînd cei doi lobi ai mantalei. În mijlocul larvei, spre ținâna cochiliei, se dezvoltă un pliu, prima schițare a piciorului și o glandă bissogenă. Aceasta produce un filament larvar lipicios. Pe fața internă a mantalei, aproape de margine se formează 4 tufe de peri senzitivi lungi, iar pe marginea valvelor, într-un loc opus țițînei se dezvoltă cîte un colț ascuțit ca un țep mare, îndoit ca un cîrlig, din care cauză s-a dat larvei numele de *glochidium* (glochis = vîrf ascuțit).

Între branchii și acoperit în mare parte de ele se găsește piciorul, de forma unei lame de topor, format din 2 regiuni : una musculară portocalie, alta viscerală, galben-rozie, mai voluminoasă, în care se găsesc viscerele.

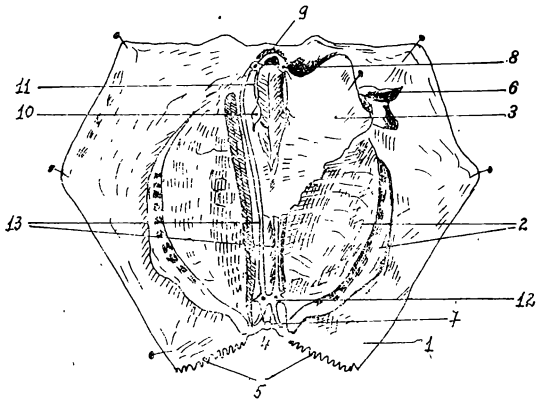


Fig. 18. Anodonta cygnea — complexul paleal : 1 — manta ; 2 — branchie ; 3 — picior ; 4 — sifon cloacal ; 5 — sifon branchial ; 6 — palpi labiali ; 7 — anus ; 8 — ganglion cerebroid ; 9 — comisură cerebroidă ; 10 — ganglion pedios ; 11 — conectiv cerebro-pedios ; 12 — ganglioni viscerali ; 13 — conective cerebro-viscerale.

În urma piciorului, branchiile se sudează între ele prin baza lor pe linie mediană, dar și de peretele mantalei, astfel că se formează un sept orizontal care împarte spațiul paleal în 2 etaje : unul superior, cavitatea cloacală, care comunică cu exteriorul prin orificiul cloacal, altul inferior, cavitatea branchială, care se deschide prin orificiul branchial. Între picior și foița branchială internă se văd organele lui Bojanus, iar la baza lamelei branchiale interne, 2 mici papile alăturate, fiecare, în mijloc, cu cîte un orificiu. Orificiul cel mai dorsal este cel excretor (spre branchii), iar celălalt spre picior, orificiul genital.

În complexul paleal, la extremitatea anterioară a corpului, sub mușchiul adductor anterior, se găsește orificiul bucal mărginit de fiecare parte de cîte 2 palpi labiali, mari, triunghiulari, a căror suprafață este acoperită de un epiteliu ciliat, bogat în celule mucoase.

Odată cu studiul organelor din complexul paleal, se evidențiază și *sistemul nervos* (Fig. 18, 19) alcătuit din 3 perechi de ganglioni nervoși de culoare portocalie, legați între ei prin cordoane nervoase și din nervi care merg la diferite organe.

În colțurile gurii, la baza palpilor labiali, se găsește de o parte și de alta, cîte un ganglion cerebroid. Comisura cerebroidă care îi leagă trece pe deasupra esofagului, realizînd o curbă mare.

În picior, aproape de limita cu sacul visceral se găsesc 2 ganglioni pedioși, așa de alipiți unul de altul încît lipsește comisura pedioasă. Ei

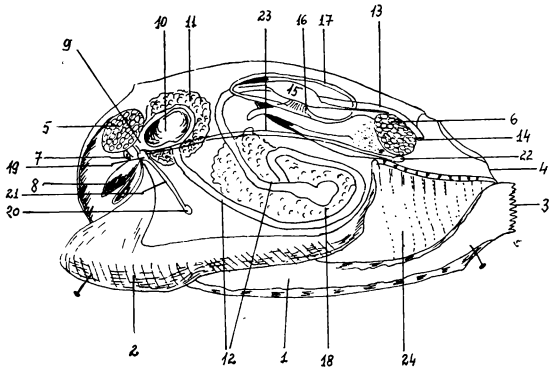


Fig. 19. Anodonta cygnea — organizația internă : 1 — manta ; 2 — picior ; 3 — sifon branchial ; 4 — sifon cloacal ; 5 — mușchi adductor anterior ; 6 — mușchi adductor posterior ; 7 — orificiul bucal ; 8 — palpi labiali ; 9 — esofag ; 10 — stomac ; 11 — hepatopancreas ; 12 — intestin ; 13 — rectum ; 14 — orificiul anal ; 15 — ventricul ; 16 — auricul ; 17 — pericard ; 18 — gonada ; 19 — ganglion cerebroid ; 20 — ganglion pedios ; 21 — conectiv cerebro-pedios ; 22 — ganglion visceral ; 23 — conectiv cerebro-visceral ; 24 — branchie.

sînt legați de ganglionii cerebroizi prin conective cerebro-pedioase, al căror traect este cuprins în întregime în picior.

La partea posterioară a animalului se găsesc 2 ganglioni viscerali, alipiți de fața ventrală a mușchiului adductor posterior. Lipsește comisura viscerală. Ei sînt legați de ganglionii cerebroizi prin 2 conective cerebro-viscerale. Pentru urmărirea traiectului lor se desface epiteliul care acoperă organul lui Bojanus.

Ganglionii cerebroizi inervează gura, palpii labiali, regiunea anterioară a mantalei, mușchiul adductor anterior.

Ganglionii viscerali inervează organele din sacul visceral, branchiile,regiunea palcală posterioară și laterală, mușchiul adductor posterior și în special regiunea sifoanelor.

Nervii ganglionilor pedioși se resfiră în masa musculară a piciorului.

Pentru urmărirea traiectului digestiv se procedează astfel : animalul, învelit în cei doi lobi ai mantalei, se așează cu una din laturi pe fundul castronului de disecție. Se îndepărtează lobul mantalei, branchia și palpii labiali de pe latura opusă. Cu o foarfecă se taie tangențial sacul visceral prelevînd traiectul intestinului după traiectul anselor sale,

de culoare galben-brunie. Se introduce apoi prin orificiul bucal o baghetă de sticlă pentru a urmări și a secționa corect intestinul anterior.

Aparatul digestiv astfel evidențiat, fără a fi detașat, datorită structurii spongioase a parenchimului corpului (Fig. 19), începe cu orificiul bucal situat ventral față de adductorul anterior; urmează un esofag scurt și un stomac voluminos, ovoid, înconjurat de hepatopancreasul mare. De la stomac pornește intestinul, un tub simplu fără dilatații sau diverticule. Aceasta după ce face 3 curburi în masa viscerală spre picior, urcă dorsal spre stomac, încheind aproximativ o figură în formă de opt. Rectul merge orizontal, paralel cu latura dorsală, străbate ventriculul, trece dorsal față de mușchiul adductor posterior și se deschide în cavitatea cloacală prin orificiul anal.

Prima îndoitură a intestinului, care urmează după stomac, are o conformație specială. De-a lungul acestei bucle peretele său formează un șanț adînc, ciliat, numit *tiflosolis*, aproape complet izolat de lumenul intestinal prin două pliuri laterale. Aici se găsește stiletul cristalin sau tija cristalină, o condensare de fermenți digestivi. El este produs de intestin și pe măsură ce se lungește, în aceiași măsură cățul său dinspre stomac pătrunde în cavitatea acestuia, unde se dizolvă treptat, elaborînd diastaze.

Glanda digestivă este situată în masa viscerală, deasupra piciorului, printre buclele tubului digestiv.

Se pot face preparate macroscopice fie cu complexul paleal fie cu aparatul circulator sau cu aparatul digestiv la Anodonta.

Fixare: alcool 70° sau formol 4%.

Montarea: pe o placă de sticlă în borcane de colecție. Se închid la fel ca celelalte preparate.

1.7.1. METODE DE COLECTARE, PREPARARE

Colectarea Moluștelor se face în diferite biotopuri și anotimpuri în funcție de grupele cercetate.

De exemplu, la munte, Gasteropdele se pot aduna chiar pe vreme uscată, Pupilidele și Clausilidele găsindu-se în orice anotimp. Pentru altele însă (Vitrinidae), colectarea trebuie făcută numai iarna, deoarece numai în acest anotimp le putem găsi vii și adulte. Vara sînt nedezvoltate, și-și trăiesc viața în pămînt.

În regiunile de șes, Pupilidele și Clausilidele nu pot fi colectate decît primăvara timpuriu sau toamna, atunci cînd cochilia este complet dezvoltată.

Colectarea Gasteropodelor se poate face direct cu mîna sau penseta. Formele mici sînt puse în tuburi de sticlă sau cutii de carton.

Limacidele se pun de obicei separat pentru că mucusul lor murdărește atît pereții cutiei cît și pe ceilalți melci. De obicei atît pentru ei cît și pentru melcii mai mari (Helix) se recomandă cutii mari de carton sau tablă (de preferat ultimele), cu un perete din sită pentru a se putea face aerisirea. În interior se pun frunze, mușchi, ierburi.

Bivalvele care trăiesc în apele puțin adînci pot fi colectate deasemenea cu mîna. Se mai pot obține, colectînd valvele scoase de valuri la țărm. Nu este cel mai convenabil mod de colectare, deoarece valvele sînt neperechi și parțial distruse.

Gasteropodele din frunzar sau cele din bușteni, pietre, pot fi adunate tot cu mîna, dar pot fi scormonite, pentru a fi observate mai ușor, cu o greblă specială, cu trei sau cinci dinți.

Gasteropodele mai mici care trăiesc în ierburi și buruieni se colectează cu ajutorul fileului trecut de mai multe ori deasupra lor. Această operațiune poate fi făcută mai ales dimineața, cînd, datorită umidității, ei se găsesc răspîndiți pe ierburi. Materialul obținut este pus în săculeț de pînză sau într-o cutie mai mare de carton și transportat în laborator.

Colectarea Moluștelor acvatice, se face cu fileul, draga sau bodengreiferul.

Fileul se întrebuințează pentru colectarea formelor fie de la suprafață sau mai de la fund. Materialul obținut este triat chiar la malul apei în momentul colectării. Se despart melcii mici de cei mai mari și mai ales de Bivalve. Pe primii îi punem în tuburi de sticlă mai rezistente, în cutii de tablă sau carton. Pe cei mai mari îi împachetăm în mușchi, plante acvatice și îi punem în saci de pînză, umeziți bine.

Lamellibranchiatele se colectează cu draga cu greblă care permite scoaterea scoicilor care stau înfipte în mîl sau nisip.

Pentru strîngerea unor cantități mai mari și de la adîncimi diferite, se utilizează bodengreiferul care scoate cantități mari de nisip sau mîl din fundul bălților sau din mare. Cu acest procedeu, alături de alte animale, se colectează cantități mari de Moluște. Acestea sînt separate fie cu ochiul liber, fie utilizînd diferite site sau ciururi pentru spălarea și scoaterea pe dimensiuni.

Într-un mod asemănător se prelucrează frunzarul din pădure, nisipul cochilior, nisipul și pietrișul de la marginea rîurilor sau aduse de torenți, care conțin un număr mare de Gasteropode. Transportate în săculeți de pînză, în laborator, probele sînt triate astfel: mai întîi printr-o sită cu ochiuri mai mici (2 sau sub 2 mm) se lasă să treacă un curent de apă. Melcii fiind mai ușori vor ieși la suprafață de unde vor fi adunați. Pentru a se separa melcii de celelalte impurități, se lasă să se usuce. Apoi materialul este triat prin site sau ciururi de dimensiuni diferite.

Se mai pot procura Gasteropode acvatice și Lamellibranchiate cu o plasă de pescuit sau năvod.

Aduse în laborator moluștele trebuiesc preparate imediat pentru a împiedica alterarea rapidă a lor. Astfel se separă, de exemplu, melcii mari de cei mici, iar dintre cei mici se aleg cei care nu pot fi scoși din cochilie. Sînt lăsați să se usuce lent în locuri uscate și bine aerisite (nu la soare sau altă sursă de căldură).

Melcii operculați mai mari sau mai mici vor fi și ei separați, pentru ca în momentul în care se va proceda la omorîrea animalului să se țină seama de acest caracter.

Pentru scoaterea animalului din cochilia asimetrică a gasteropodelor se procedează astfel: sînt tratați întîi, cîteva minute, cu apă fierbinte. Cu un ac ascuțit sau cu unul în formă de tirbușon al cărui capăt este îndoit ca un cîrlig și care se introduce în cochilie, se scoate partea moale a animalului. Se clătește apoi cochilia de mai multe ori cu apă de robinet și este lăsată să se usuce la umbră (lumina soarelui o decolorează). Cochiliile goale și uscate sînt gata de a fi păstrate în cutii de colecție.

Odată determinate precis, vor fi așezate după gen și specie, familii și ordine.

În cazul păstrării valvelor pentru colecții, operația curățirii valvelor se face astfel : se taie cu ajutorul unui bisturiu mușchii adductori, valvele fiind curățate de corpul moale și de resturile de mușchi. Sînt lăsate apoi să se usuce. Pentru a se păstra în bune condiții valvele subțiri ale speciilor mari, se ung cu ulei pentru a nu crăpa.

În colecție se așează una din valve cu fața internă, cealaltă extern.

În cazul în care dorim să păstrăm un melc sau o scoică în întregime — cochilia și partea moale — sau dacă avem deaface cu un *Limax* se procedează astfel : pentru a împiedica contractarea melcilor prin fixare, ei sînt introduși în apa fierbite și răcită, în care se pun cîteva picături de hidroxilamină neutralizată cu acid clorhidric. Melcii vor muri după 6—8 ore, avînd corpul complet întins.

Pentru anestezie se recomandă : soluție de nicotină foarte slab concentrată sau soluție de cocaină pusă în apă.

Atît Gasteropodele, Lamellibranchiatele cît și Cefalopodele se fixează și se păstrează în alcool 70°. Se fixează pe o placă de sticlă și se introduc în borcane anatomice cu lichidul conservant.

Limacidele pot fi omorîte numai prin asfixie în apă fiartă de mai multe ori și răcită, ținuți 2—3 zile la întuneric. Se pun pe o placă de plută și se înlătură mucusul prin frecare cu o perie de dinți cu părul mai moale. Se întinde și se fixează animalul pe placa de plută. Se tratează cu o soluție de alcool sau formol din ce în ce mai concentrată pînă la concentrația normală (alcool 90°). Fixat apoi pe o placă de sticlă, este montat definitiv în borcane de colecție.

Colecțiile de cochilii sau de animale conservate în alcool se vor păstra întotdeauna la întuneric sau la o lumină slabă, deoarece lumina solară decolorează cochiliile și tegumentul.

1.7.2. COLECȚIE CU SPECII COMUNE DE MOLUȘTE DIN FAUNA ȚĂRII NOASTRE

Speciile comune de moluște din fauna țării noastre aparțin clasei Gasteropode și Lamellibranchiate. La fiecare clasă în parte se fac referiri asupra caracterelor importante care servesc la identificarea speciilor îndeosebi structura cochiliei.

1.7.2.1. Clasa Gasteropode (Gasteropoda)

Forme marine, de apă dulce și terestre.

Cap anterior, picior ventral, musculos. Masa viscerală dorsal asimetrică, acoperită de o cochilie calcaroasă unică și ea asimetrică, de cele mai multe ori răsucită în spirală, în jurul unui ax central numit columelă. Răsucirea se face în general de la stînga la dreapta, astfel că deschiderea cochiliei cade pe dreapta și în acest caz cochilia este dextră. Cînd răsucirea este inversă, caz mai rar, cochilia este senestră. Pe suprafața cochiliei se observă numeroase striuri de creștere, care merg paralel cu peristomul, și coaste sau striuri ornamentale.

Vîrful cochiliei se numește apex, iar deschiderea apertură. Marginea aperturii poartă numele de peristom. Acesta poate fi întreg, peri-

stom holostom sau poate prezenta un jghiab, uneori foarte lung, sifon paleal, în care intră o prelungire a mantalei și în acest caz peristomul este sifonostom.

Practic cochilia se orientează în felul următor : se ține cochilia în poziție verticală între degetul mare și cel arătător, cu apexul în sus. Se răsucește apoi cochilia în jurul axului său, pînă ce apertura ajunge complet în fața cercetătorului. Dacă apertura este pe dreapta, cochilia este senestră. Sînt unele specii la care unii indivizi au cochilia dextră, iar alții senestră (Clausilia).

1.7.2.1.1. Subclasa Prosobranchiate (Prosobranchiata)

Forme în majoritate marine, puține de apă dulce sau terestre. Branchiile (ctenidiile) înaintea inimii, de unde denumirea subclasei.

Sistemul nervos chiastoneur. Sexe separate.

Ord. Monotocarde (Ctenobranchiata).

Inima asimetrică, cu un singur auricul și ventricul. Branchiile au lamele pe o singură parte.

Viviparus viviparus (= Paludina vivipara) (Fig. 20). Formă de apă dulce, frecventă în apele stătătoare. Cochilia răsucită într-o spirală co-

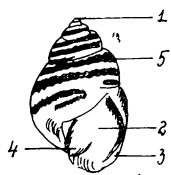


Fig. 20. Viviparus viviparus — cochilie : 1 — apex ; 2 — apertură ; 3 — peristom ; 4 — opercul ; 5 — dungi ornamentale.

nică, de culoarea mîlului, prezintă 3 benzi longitudinale brun-închise pe ultimul tur de spiră. Peristom holostom. Cochilia cu opercul subțire, cornos, spiralat. Naște pui vii.

Nassa reticula (Fig. 21).

Fig. 21. Nassa reticulata — cochilie.
Fig. 22. Cyclope neritea. a. — vedere dorsală ; b. — vedere ventrală.

Specie marină. Numeroase exemplare pe litoralul Mării Negre. Cochilia relativ înaltă ; 2,5—3 cm lungime. Ultima tură de spiră este mai mare decît celelalte. Peristom sifonostom. Ornamentația reticulată. Cochiliile de *Nassa* servesc drept adăpost pentru pagurii din Marea Neagră.

Cyclope neritea (Fig. 22).

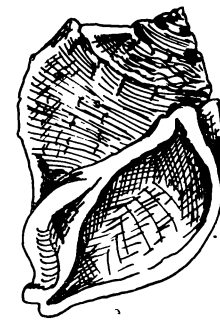


Fig. 23. Rapana thomasiana — cochilie.

Comună în Marea Neagră. Cochilia mică, brună, dextră. Apexul turtit, peristomul sifonostom.

Rapana thomasiana (Fig. 23).

Specie marină, pătrunsă de curînd în Marea Neagră, unde atacă băncurile de stridii și midii. Cochilia mare, solidă, cu pereți relativ groși. Apexul ascuțit, apertura mare, peristom sifonostom. Ultima tură de spiră mai mare ca celelalte.

1.7.2.1.2. Subclasa Pulmonate (Pulmonata)

Cuprinde specii terestre sau secundar adaptate la viața acuatică. Cele terestre respiră prin plămîn, reprezentat prin mantaua puternic vascularizată și care comunică cu exteriorul printr-un orificiu numit pneumostom, iar cele acuatice prin branchii secundare.

Cochilia asimetrică, dextră sau senestră, prezintă regresiuni pînă la dispariția totală. Una sau două perechi de tentacule. Ochii la baza tentaculelor sau în vîrful perechii a doua. Inima asimetrică. Orificiile genitale distincte. Pulmonatele cuprind două ordine.

Ord. 1. Basomatofore (Bassomatophora)

Prezintă o pereche de tentacule nerctractile. Ochii la baza lor. Cochilia externă totdeauna prezentă. Forme de apă dulce.

Limnaea stagnalis (Fig. 24).

Cochilia dextră, înaltă, subțire și friabilă, cu apexul ascuțit. Ultima spiră mare. Apertura largă, peristom holostom oval și oblic. Tentacule triunghiulare.

Frecventă în apele stătătoare de la șes, bogate în vegetație. Ajunge pînă la altitudinea de 1700 m.

Planorbis corneus (Fig. 25).

Cochilie relativ mare, răsucită într-un singur plan, senestră. Prezintă branchii secundare, sîngele cu hemoglobină. Apertura reniformă, peristom holostom.

Culoare brun-verzui întunecat. Comun în apele stătătoare sau ușor curgătoare, bogate în vegetație.

Tropidiscus carinatus (Fig. 26).

fig. 24

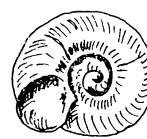


fig. 25

fig. 26

fig. 27

Fig. 24. Limnea stagnalis — cochilie.
Fig. 26. Tropidiscus carinatus — cochilie.
Fig. 25. Planorbis corneus — cochilie.
Fig. 27. Causilia dubia — cochilie.

Frecvent în apele stătătoare sau ușor curgătoare. Cochilie subțire și fină, cu aspect cornos, apertura oblică. Ultimul anfract posedă pe mijloc o carenă.

Ord. 2. Stilomatofore (Stylomatophora)

Două perechi de tentacule retractile. Ochii în vîrful perechii a doua de tentacule, mai lungi.

Forme cu cochilie, în general, bine dezvoltată. La unele specii ea se reduce sau dispare complet.

Clausilia dubia (Fig. 27).

Trăiește, de obicei, la munte, pe stîncile umede cu mușchi și licheni.

Cochilia întotdeauna senestră, mult alungită. Apertura mică, cu creste, prezintă inferior un jgheab.

Caracteristic este aparatul de închidere al cochiliei numit *clausilium*.

Zebrin dendrida (Fig. 28).

Specie bine reprezentată în fauna țării noastre, în regiuni de deal și cîmpie. Gazda intermediară pentru *Dicrocoelium*.

Fig. 28 Zebrina dendrida — cochilie

Fig. 29. Limax cinereo-niger.

Cochilie înaltă, tare, opacă, apex bont, apertură eliptică.

Lixam cinereo-niger (Fig. 29).

Cochilie redusă la un mic solz sub scutul dorsal evident; carena evidentă. Pneumostomul posterior, pe dreapta. Este de culoare neagră-cenușie sau neagră cu carena albă. Trăiește în pădurile din zonele montane.

Helix pomatias (Fig. 30).

Fig. 30. Helix pomatias — cochilie.
Fig. 31. Cepaea nemoralis — cochilie.

Cochilia globuloasă, de culoare galben-maroniu cu dungi longitudinale cafenii. Apexul conic, apertura și peristomul rotund.

În țara noastră trăiește în locuri cu multă umezeală. Iarna își acoperă apertura cu un opercul calcaros.

Cepaea nemoralis (Fig. 31).

Cochilia globuloasă, de culoare alb-murdar, prezintă dungi ornamentale brune. Peristom holostom. Frecventă la șes.

1.7.2.2. Clasa Lamellibranchiate

(Lamellibranchiata = Pelecipoda = Acephala = Bivalvia)

Moluște cu o cochilie bivalvă secretată de manta; lipsite de cap; picior în formă de topor, cu o parte musculară și una viscerală; branchii lamelare. De cele mai multe ori cele două valve sînt simetrice, una dreaptă, alta stîngă. Mai rar, sînt asimetrice, una fiind mai dezvoltată, pe ea stînd animalul, cealaltă servindu-i drept căpăcel.

Fiecare valvă prezintă o margine anterioară, una posterioară, o latură dorsală și una ventrală. Dorsal, extern sau intern, se află ligamentul care leagă cele două valve între ele iar dorsal și intern aria cardinală, unde se găsesc dinți și fosete formînd țiția. Dentiția poate fi *taxodontă*, alcătuită din dinți asemănători și ordonat dispuși, alternînd cu fosete și *heterodontă* din dinți cu forme și poziții diferite, dinți cardinali și laterali, cărora le corespund pe cealaltă valvă, fosete. La unele forme dentiția este redusă sau dispare complet. Înaintea ligamentului, de regulă anterior, cochilia prezintă un *apex* sau *umbone*. Mai rar apexul este excentric sau îndreptat posterior.

Marginea anterioară este rotunjită, cea posterioară efilată. În general, verticala coborîtă de la apex către latura dorsală împarte cochilia în două jumătăți inegale, cea anterioară mai mică, cea posterioară mai mare.

Extern, cochilia prezintă striuri de creștere, concentrice în jurul apexului și striuri, sau coaste ornamentale radiare, pornind de la apex.

Pe fața internă a valvelor sînt impresiunile mușchilor adductori: anterior și posterior. În general cei doi mușchi adductori sînt egal dezvoltați și în acest caz lamellibranchiatele aparțin tipului dimiar izomiar. La alte forme, unul din adductori, cel anterior, se reduce astfel lamellibranchiatele sînt dimiare anisomiare. La altele, adductorul anterior dispare complet, adductorul posterior luînd o poziție mediană. În acest caz vorbim de lamellibranchiatele monomiare.

Deasupra impresiunii mușchiului adductor anterior și posterior se observă impresia mușchiului retractor anterior și respectiv retractorul posterior al piciorului. Sub impresia adductorului anterior este evidentă impresia mușchiului protractor.

Între impresiunea mușchiului adductor anterior și posterior se întinde impresiunea mantalei sau impresia paleală. Ea reprezintă inserția mușchilor marginii mantalei. La Lamellibranchiatele *Integripaleata* aceasta este întreagă, la *Sinupaleata* impresiunea paleală prezintă un intrînd, numit sinus paleal, a cărui poziție este întotdeauna posterioară.

Lamellibranchiatele cuprind 5 ordine. Formele cele mai comune din fauna țării noastre aparțin următoarelor ordine:

Ordinul Eulamellibranchiate

(Eulamellibranchata, Metabranchiata, Heterodonta).

Branchia constituită din două foițe sau lamele branchiale, este ca un grătar. Dentiția heterodontă.

A. Integripaleate — impresiunea palcală continuă.

Unio crassus = scoica de rîu (Fig. 32—33).

Trăiește în apele limpezi curgătoare, fiind mai abundentă în mîl, de unde culoarea lor brun-măslinie. Valvele groase, stratul de sidef bine dezvoltat.

Impresiunile musculare adînci sub formă de fosete.

Dentiția: valva dreaptă cu un dinte cardinal și un dinte lateral lung și subțire; valva stîngă cu 2 dinți cardinali și un dinte lateral bifid.

Anodonta cygnea = scoica de lac (Fig. 34—35).

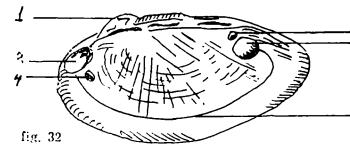


Fig. 32—33. Unio crassus — cochilie : 32 — valva dreaptă ; 33 — valva stîngă : 1 — umbone ; 2 — impresiunea mușchiului adductor anterior ; 3 — impresiunea mușchiului retractor anterior al piciorului ; 4 — impresiunea mușchiului protractor al piciorului ; 5 — impresiunea mușchiului adductor posterior ; 6 — impresiunea mușchiului retractor posterior al piciorului ; 7 — impresiunea paleală ; 8 — aria cardinală.

fig. 32

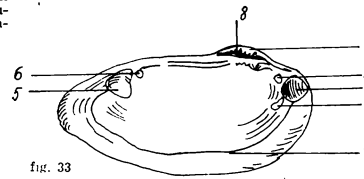


fig. 33

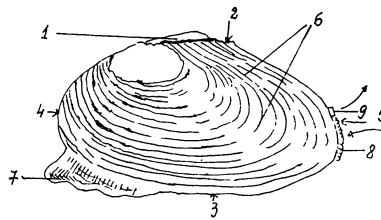


Fig. 34. Anodonta cygnea — valva stîngă — fața externă : 1 — umbone ; 2 — marginea dorsală ; 3 — marginea ventrală ; 4 — marginea anterioară ; 5 — marginea posterioară ; 6 — striuri de creștere ; 7 — picior ; 8 — sifon branchial ; 9 — sifon cloacal ; săgețile indică sensul circulației apei.

Cochilia mare, alungită, fragilă, lipsită de ţîţînă, are marginea anterioară rotunjită, cea posterioară trunchiată. Apexul îndreptat anterior. Sideful puţin dezvoltat. Intern impresiunile mușchilor adductori și ai mușchilor motori ai piciorului.

Frecvență în apele de la **Șes.**

● *Cardium edule* (Fig. 36).

Specie marină, izomiară, integripaleată, comună pe litoralul Mării Negre.

Cochilia groasă, rezistentă, cu cele două valve egal dezvoltate, prezintă coaste radiare pronunţate. Umbonele situat aproximativ la mijlocul valvelor.

Ţîţîna : valva dreaptă : 2 dinţi cardinali și o fosetă, 4 dinţi laterali : 2 anteriori și 2 posteriori fiecare separaţi de cîte o fosetă ; valva stîngă :

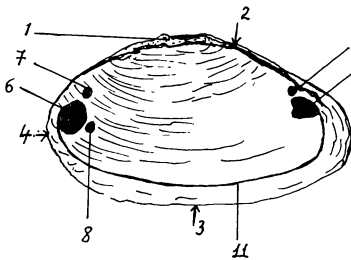


Fig. 35. Anodonta cygnea — valva dreaptă — fața internă : 1 — umbone ; 2 — marginea dorsală ; 3 — marginea ventrală ; 4 — marginea anterioară ; 5 — marginea posterioară , 6 — impresiunea mușchiului adductor anterior ; 7 — impresiunea mușchiului retractor anterior al picioruluí ; 8 — impresiunea mușchiului protractor al piciorului ; 9 — impresiunea mușchiului adductor posterior ; 10 — impresiunea mușchiului retractor posterior al piciorului ; 11 — impresiunea palcală.

un dinte cardinal încadrat de 2 fosete, 2 dinți laterali, unul anterior și altul posterior, fiecare încadrat de cîte două fosete.

Dreissena polymorpha (Fig. 37).

Relict ponto-caspic. Cochilia mitiloidă cu apexul excentric și o carenă pronunțată. Se fixează prin bissus.

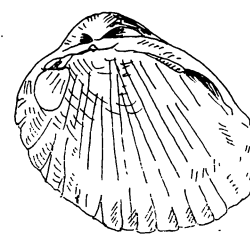


Fig. 36. Cardium edule — valva dreaptă, fața internă.

B. *Sinupaleate* — impresia mantalei cu un sinus paleal.

• *Venus gallina* (Fig. 38)

Cochilia rotundă sau ovală, groasă, echivalvă, cu striuri concentrice pronunțate. Trei dinți divergenți pe fiecare valvă. Sinusul paleal în formă de V în imediata vecinătate a adductului posterior.

Abundă în Marea Neagră, în faciesul nisipos.

• *Donax trunculus* (Fig. 39)

Cochilia echivalvă, de culoare albă cu dungi violacei, are apexul posterior, astfel că linia ce coboară de la el împarte fiecare valvă în 2

Fig. 37. Dreissena polymorpha — valva stîngă : a — fața internă ; b — fața externă.

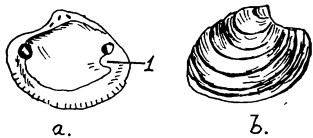


Fig. 38. Venus gallna — valva dreaptă : a. fața internă ; b. fața externă : 1 — sinus paleal.

jumătăți inegale : cea anterioară mai mare decît cea posterioară. Striurile de creștere și ornamentale proeminente. Sinusul paleal mare.

Dentiția : pe fiecare valvă cîte 2 dinți cardinali. Dinții laterali atrofiați.

Frecventă în zona de litoral, în faciesul nisipos.

● *Angulus exiguus* = Tellina exiguus = unghiuța (Fig. 40).

Cochilia echivalvă subțire, de culoare albă sau roz. Apexul îndreptat posterior și slab dezvoltat. Sinusul paleal mare și adînc. Intern cei 2 mușchi adductori.

Țiținа : valva dreaptă un dinte cardinal bifid ; valva stîngă 2 dinți cardinali.

Trăiește în faciesul nisipos. În număr mare în nisipul din lungul țărmurilor Mării Negre.

● *Solen marginatus* = cuțit de mare (Fig. 41)

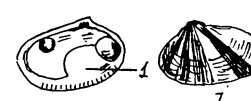


Fig. 39. Donax trunculus — valva dreaptă : a. fața internă ; b. fața externă : 1 — sinus paleal.

Fig. 40. Anqulus exiguus — valva stîngă : a. fața externă ; b. fața internă : 1 — sinus paleal.

Cochilia subcilindrică, relativ rezistentă, are apexul terminal și striurile de creștere cu dispoziție concentrică caracteristică. Sinus paleal digitiform. Cochilia în ansamblu are aspectul unor prăsele de brieeag. Sifoanele lungi, concrescute. Trăiește înfipt în nisip, în galerii verticale, în locurile liniștite de lîngă mal. Pe litoralul românesc se găsește, în special, în zona complexului Razelm-Sinoe și în dreptul Portiței.

Pholas dactylus (Fig. 42)

Cochilie echivalvă, alungită, cu valvele bombate, subțiri. Anterior se prelungește cu o apofiză, iar jumătatea posterioară este mult efilată.

Fig. 41. Solen marginatus — valva dreaptă : a. fața externă ; b. fața internă.

Nu posedă țiținâ, nici ligament. Mușchiul adductor anterior este extern. Sifoane lungi, concrescute. Dorsal, în locul ligamentului, plăci accesorii calcare care acoperă umbonele. Pe suprafață coaste ornamentale și striuri de creștere proeminente, care formează la întretăierea lor rugozități cu aspect de solzi. Sapă galerii în stînci și construcții subacvative.

Mya arenaria (Fig. 43)

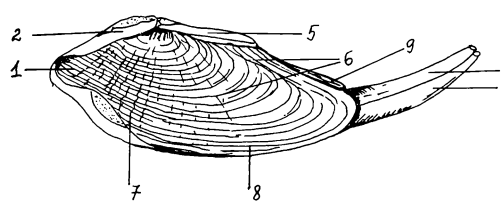


Fig. 42. Pholas dactylus — cochilie : 1 — apofiză ; 2 — mușchi adductor anterior ; 3 — sifon cloacal ; 4 — sifon branchial ; 5 — plăci accesorii ; 6 — striuri de creștere ; 7 — coaste ornamentale ; 8 — valva dreaptă ; 9 — valva stîngă.

Cochilie albicioasă, aproximativ 12 cm lungime, cu apexul median. Izomiară. Sinusul paleal posterior. Extern striurile și crestele ornamentale puțin evidente.

Ord. Anizomiare (Anysomyarya)

Mușchiul adductor anterior atrofiat sau absent.

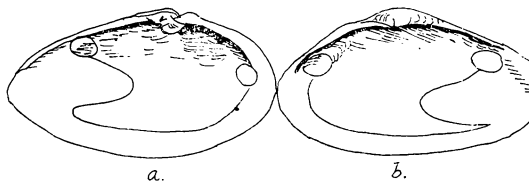


Fig. 43. Mya arenaria — fața internă : a. valva stîngă ; b. valva dreaptă.

Mytilus galloprovincialis = Mytilus edulis = midia (Fig. 44)

Cochilie triunghiulară de culoare neagră-violacee. Apexul anterior și excentric. Marginea ventrală dreaptă, cea dorsală, curbată. Mușchiul adductor anterior mic, ventral, iar cel posterior mare, dorsal. Ligamentul intern și subțire.

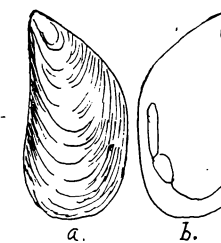


Fig. 44. Mytilus galloprovincialis — valva stîngă : a. fața externă ; b. fața internă.

Animalul se fixează prin bissus. Trăiește în bancuri, formînd faciesul mitiloid, care se întinde de-a lungul țărmurilor stîncoase. Comestibilă.

Ostrea taurica = stridie (Fig. 45)

Cochilie inechivalvă. Valva stîngă este mai mare și pe ea stă animalul, cea dreaptă plană, ca un căpăcel. Valvele foarte groase formate din numeroase straturi. Culoarea alb-murdar.

Formă monomiară : mușchiul adductor anterior a dispărut, cel posterior este median.

Trăiește fixată pe stîncile din zona litorală. Comestibilă.

1.8. ÎNCRENGĂTURA ANELIDE (ANELIDA)

Viermi celomați cu simetrie bilaterală. Metamerie homonomă și heteronomă. Segmentele corpului cu sau fără apendice perechi ambulatoare, tactile sau respiratoare. Tubul digestiv complet, simplu și drept. Organele excretoare segmentare, metanefridii. Sistemul circulator în-

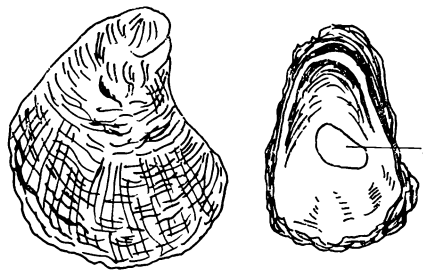


Fig. 45. Ostrea taurica: a — fața externă; b — fața internă: 1 — impresiunea mușchiului adductor posterior.

chis de origine blastocelină. Sistemul nervos ganglionar scalariform. Sexe separate, rar hemafrodite. Forme în majoritate libere. Primitiv marine, au trecut apoi în apa dulce, mediul terestru și subteran. Unele parazite.

Tip de structură: — *Lumbricus terrestris* (Clasa Oligocheta)
— *Hirudo medicinalis* (Clasa Hirudinea)

Lumbricus terrestris (rîma) trăiește în bălegar, pămînt gras, în grădini și cîmp. Se pot colecta tot timpul anului, exceptînd iarna. Iese la suprafață în timpul nopții și mai ales după ploaie. Pot fi ținute în laborator, în lădițe cu pămînt gras și umed, hrănindu-le cu zarzavaturi tocate sau cartofi.

Morfologie externă (Fig. 46). Corpul alungit, extremitățile ascuțite, aproape subcilindrice, turtit dorso-ventral, mai ales în partea posterioară. Lungimea corpului variază de la 5 la 30 cm, numărul segmentelor poate fi între 110—180, crescînd cu vîrsta. Tegumentul este de culoare brună-roză-pămîntie, mai închis la culoare pe partea dorsală.

Prostomiul sau lobul cefalic este redus și lipsit de organe de simț.

Trunchiul sau zona metamerizată are numeroase segmente homonome. Fiecare segment are 4 cheți dispuși în 4 perechi, formînd 4 șiruri longitudinale de fascicole latero-ventrale și latero-dorsale. Privind cu o lupă suprafața corpului se observă cheții care sînt simpli, scurți în formă de S, cu un nod la mijloc, cheți sigmoizi, înfipți direct în tegument, cu vîrful îndreptat înapoi.

Între segmentele 9—10 și 10—11 ale zonei se observă cîte două orificii latero-dorsale care reprezintă orificii ale receptaculelor seminale. Pe segmentul 14, între șirurile ventrale de cheți, se găsesc cele 2 orificii genitale femele, iar pe segmentul 15, două orificii mascule înconjurate de o arie glandulară.

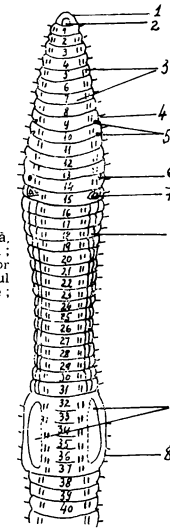


Fig. 46. Lumbricus terrestris — morfologie externă, vedere ventrală : 1 — prostomiu ; 2 — orificiul bucal ; 3 — metamere ; 4 — cheți ; 5 — orificiile receptaculelor seminale ; 6 — orificiul genital femel ; 7 — orificiul genital mascul ; 8 — clitelum ; 9 — creste de pubertate ; 10 — șanț seminal.

Din luna februarie pînă în august în porțiunea anterioară a trunchiului unei rîme mature, între segmentele 32—37, se găsește o îngroșare ca o șa, de culoare deschisă, numită clitelum, cu rol în împerechere și formarea coconului. Marginile laterale ale clitelului ies în evidență ca niște umflături longitudinale, numite creste de pubertale.

De la orificiile genitale mascule pînă la segmentul 37, lateral, se întinde cîte un șanț seminal pentru scurgerea spermei în timpul împerecherii.

Pe părțile latero-ventrale ale fiecărui segment cu excepția primelor 3—4 segmente și ultimul segment, se află cîte un orificiu excretor. La rîmele bine întinse, pe partea medio-dorsală, în cutele în care separă metamerele se găsesc pori fini, prin care celomul comunică cu exteriorul.

Ultima regiune a corpului, pigidiul, poartă ventral anusul, oval transversal.

Morfologia internă (Fig. 47) se studiază pe disecții care se execută după același procedeu pe care l-am indicat la *Ascaris*. Animalul se cloroformizează și apoi se așează cu fața dorsală în sus în castronul de disecție, în care s-a pus apă cu clorură de sodiu (0,43% NaCl). Se în-

tinde viermele fără a-l rupe şi îl fixăm prin ace de gămălie, la cele 2 extremităţi. Incizia se execută, pornind de la partea anterioară, pe linia mediană dorsală, indicată de vasul dorsal, cît mai superficial. Către partea posterioară incizia se face puţin mai lateral.

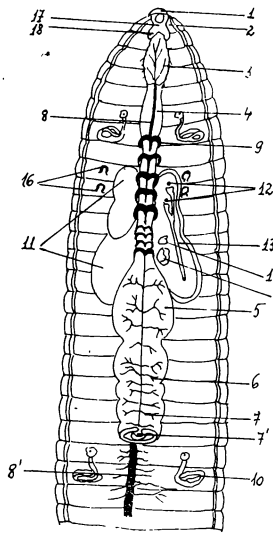


Fig. 47. Lumbricus terrestris — morfologie internă: 1 — prostomiu; 2 — peristomiu; 3 — faringe; 4 — esofag; 5 — stomac glandular; 6 — stomac musculos; 7 — intestin; 7' — tiflosolis; 8 — vas de sînge dorsal; 8' — vas de sînge ventral; 9 — inimi contractile; 10 — metanefridie; 11 — vezicule seminale; 12 — testicule; 13 — canal deferent; 14 — ovar; 15 — oviduct; 16 — receptacule seminale; 17 — creier; 18 — inel periesofagian.

După deschiderea cavităţii corpului, cu un bisturiu fin sau cu un ac spatulat, se degajă organele interne. Apoi se răsfrîng laturile corpului şi se prind în ace de gămălie. Dacă este necesar se taie disepimentele, membrane fine care împart cavitatea corpului în inele.

Sistemul digestiv începe cu orificiul bucal, apoi cavitatea bucală mică, musculoasă, după care urmează faringele saciform şi extensibil, dorsal puternic musculos şi glandular constituind bulbul faringian. Faringele se continuă cu esofagul, mai subţire, care se întinde între segmentele VII—XIII. Porţiunea sa posterioară, cuprinsă între segmentele X—XII, este evaginată de ambele părţi, formînd 3 perechi de saci, mici, albi, numiţi glandele lui Morren sau glandele calcifere, bogat vascularizate. Ultimele două sînt glande secretoare de carbonat de calciu, iar cele anterioare sînt numite rezervoare.

Ele participă la reglarea pH în sînge și în lichidul celomic ; își desfășoară activitatea ciclic. După esofag urmează gușa rotundă, stomacul glandular și imediat stomacul musculos (pipota).

Intestinul care îi succede acestuia din urmă, este acoperit în parte de celule cloragogene cu rol de acumulare a substanțelor de excreție. Partea dorsală a intestinului, pe o mare întindere, prezintă o invaginație cutată, tiflosolis, care mărește suprafața de digestie. Anusul se deschide ventral, pe pigidiu.

Sistemul circulator este închis. El este format dintr-un puternic vas dorsal care se observă deasupra tubului digestiv. Din el, în regiunea anterioară, esofagiană, în segmentele VII—XI, pornesc de fiecare parte inele vasculare sau inimi contractile (în număr de 5) care înconjoară esofagul. Există o rețea fină de capilare în tegument, pe intestin și alte organe. Sîngele conține eritrocruonină dizolvată în plasmă și celule libere.

Sistemul excretor este reprezentat prin cîte o pereche de metanefridii în fiecare segment. Lipsesc în primele trei segmente și ultimele. Fiecare metanefridie este formată dintr-o pîlnie ciliată sau nefrostom (el se observă prin tragerea cu atenție a intestinului lateral) și un canal excretor care străbate disepimentul și trece în segmentul următor. Terminal, înainte de deschidere prin porul excretor sau nefridiopor situat pe laturile segmentului, canalul excretor prezintă o vezică contractilă sau urinară.

Sistemul genital. Lumbricus terrestris este hermafrodit. Vom descrie organele genitale așa cum apar în disecție.

La deschiderea cavității corpului apar 3 perechi de vezicule mari, de culoare alb-gălbuie, situate în segmentele IX—XIII. Acestea sînt veziculele seminale pline cu spermatozoizi și gregarine monocistidee.

Înlăturînd esofagul se observă, cu ajutorul unei lupe, 2 perechi de testicule mici, situate în segmentele X și XI. Înapoia fiecărui testicul se află cîte o pîlnie ciliată continuată printr-un canal deferent.

Organul genital femel este reprezentat de o pereche de ovare, mici, albicioase, opace, situate în segmentul 13. De la acestea pornesc oviducte scurte, care se deschid pe partea ventrală a segmentului 14. Între segmentele 9 și 10, lateral, se pot vedea 2 perechi de receptacule seminale, invaginări ectodermice, albe, în care se înmagazinează spermatozoizii partenerului.

Sistemul nervos. Este constituit dintr-un creier simplu, un inel periesofagian și un lanț ganglionar ventral, care se pune în evidență prin ridicarea tubului digestiv și pipetarea pe el a unei soluții diluate de acid azotic (1%).

Hirudo medicinalis (lipitoarea comună), specie de apă dulce, întîlnindu-se frecvent în bălți și lacuri. Este ectoparazită temporar, hrănindu-se cu sîngele vertebratelor homeoterme.

Morfologia externă (Fig. 48). Corpul puternic turtit dorso-ventral ; fața dorsală convexă ; cea centrală plată.

Extremitatea anterioară, mai îngustă, se termină cu o ventuză anterioară, în centrul căreia se află orificiul bucal, orientat ventral. Ea provine din modificarea primelor 4 segmente anterioare.

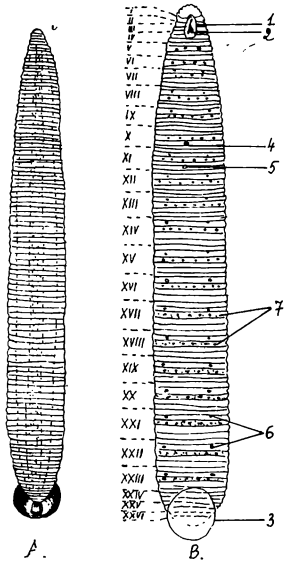


Fig. 48. Hirudo medicinalis — morfologie externă ; A — vedere dorsală ; B — vedere ventrală ; 1 — ventuza bucală ; 2 — orificiul bucal ; 3 — ventuza posterioară ; 4 — orificiul genital mascul ; 5 — orificiul genital femel ; 6 — orificii excretoare ; 7 — papile sensoriale.

La extremitatea posterioară, mai lată, se găsește ventuza posterioară, discoidală, îndreptată posterior, înzestrată cu o musculatură bine dezvoltată. Ea rezultă din modificarea ultimelor 7 segmente.

Dorsal de culoare brun-închis cu puncte numeroase și 6 șiruri de pete galbene-roșcate ; ventral brun-verzuie.

Pe suprafața corpului se observă 101 inele, reprezentînd după mulți autori 34 segmente, distribuite astfel : segmentele 1, 2, 26 au cîte un inel ; segmentele 3, 24, 25 două inele ; segmentele 4, 5, 6, 23 trei inele, iar celelalte, 7—22, au cîte cinci inele fiecare. Se recunosc ușor segmentele după dispoziția unui șir circular de papile senzoriale pe inelul mijlociu al fiecărui segment.

5 perechi de ochi, sub forma unor puncte negre, sînt situate pe partea dorsală a inelelor 1, 2, 3, 5, 8.

Pe linia mediană, ventral, între inelele 30—31 ale segmentului 10, se găsește orificiul genital mascul, iar pe segmentul 11 (inelele 35—36) orificiul genital femel.

Orificiile genitale sînt situate în regiunea clitelară (clitelum, centura sexuală), alcătuită din segmente hipertrofiate în perioada de reproducere.

Între segmentele 7—23, lateral, se deschid orificiile excretoare ale celor 17 perechi de metanefridii.

Deasupra ventuzei posterioare, pe ultimul inel, se află orificiul anal.

ORGANIZAȚIA INTERNĂ

Disecția se efectuează pe animalele anesteziate cu eter sau cloroform și sub apă. Se așează lipitoarea, în castronul de disecție, cu partea dorsală în sus și întinzîndu-se niței se prinde în ace de disecție la cele 2 extremități.

Se face apoi o incizie pe linia mediană a părții dorsale. Pe măsură ce înaintăm cu disecția începînd de la partea anterioară către cea posterioară, prinzînd tegumentul în ace de disecție, trebuie să curățăm organele de țesutul de umplere.

Menționăm că la Hirudinee celomul este invadat secundar de țesut conjunctiv, fiind transformat în lacune și sinusuri.

În prim plan al disecției apare tubul digestiv (Fig. 49) care începe cu orificiul bucal situat ventral în mijlocul ventuzei bucale. Orificiul bucal prezintă o buză antero-superioară în formă de potcoavă și o buză postero-inferioară care alternează cu 3 fălci chitinoase cu numeroși dinților : o falcă medio-dorsală și 2 latero-ventrale. Cu ele lipitoarea face o tăietură caracteristică în formă de Y. În această regiune, și anume, printre dinții fălcilor, se deschid glande salivare unicelulare care secretă o substanță anticoagulantă, hirudinina.

Urmează un faringe musculos cu lumen triunghiular și un esofag scurt.

Stomacul are forma unui tub care prezintă lateral 10—11 perechi de cecumuri sau diverticule. Ele servesc la înmagazinarea sîngelui. Ultima pereche este alungită și merge paralel cu peretele corpului. Între ultima pereche de cecumuri, stomacul se continuă cu intestinul cilindric și îngust, mai musculos în partea sa terminală unde se dilată într-o ampulă rectală. Se deschide la exterior prin orificiul anal, situat mediodorsal, pe ultimul inel, deasupra ventuzei posterioare.

Sistemul circulator (Fig. 49).

Datorită reducerii celomului și formării de lacune, aparatul circulator la *Hirudo medicinalis* suferă modificări. La disecție, deasupra tubului digestiv, median dorsal se observă vasul dorsal. El se întinde de la partea posterioară la cea anterioară.

Pentru evidențierea celorlalte organe, se înlătură tubul digestiv cu ajutorul unui bisturiu începînd de la partea posterioară spre cea anterioară. Se observă lacuna ventrală și lacune laterale.

Aparatul genital (Fig. 50).

Lipitoarea este hermafroditică.

Aparatul genital mascul este alcătuit din 9—10 perechi de testicule, dispuse lateral, pe segmentele 11—20. De la fiecare testicul pornește cîte un scurt canal eferent, care se deschide într-un canal deferent lon-

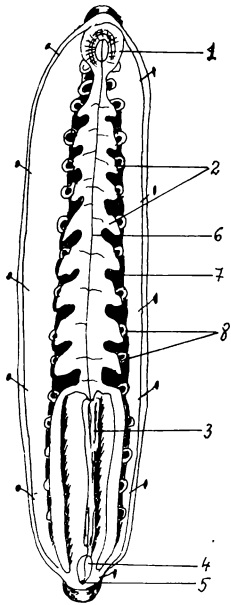


Fig. 49. Hirudo medicinalis — sistemul digestiv și sistemul circulator : 1 — faringe ; 2 — diverticule stomacale ; 3 — intestin ; 4 — ampulă rectală ; 5 — orificiul anal ; 6 — lacună dorsală ; 7 — lacună laterală ; 8 — metanefridii.

gitudinal. Pe segmentul 10, fiecare canal deferent se încolăcește formînd cîte o vezicuă seminală, epididim, răsucită ca un ghem. Cele 2 canale ejaculatoare, scurte, cu care se continuă canalele deferente, se unesc median într-un atrium, urmat de un penis lung, devaginabil. Orificiul genital mascul se găsește pe inelele 30—31. Uneori prin acesta, la animalul întreg, poate ieși penisul ca un fir subțire și albicios. La baza penisului se găsește o glandă albicioasă, prostata, cu rol de a dilua sperma.

Aparatul genital femel, este situat pe segmentul 11. El constă din două ovare, 2 oviducte, care se unesc apoi într-un vagin. Se deschide la exterior prin orificiul genital femel situat pe inelele 35—36. Vaginul prezintă o glandă anexă, glanda albuminipară.

Aparetul excretor (Fig. 50).

Este reprezentat prin 17 perechi de metanefridii situate pe segmentele 6—22. Metanefridiile sînt lipsite de pîlnia ciliată şi capsula fagocitară. Nefridia este în formă de potcoavă sau de U. Segmentul iniţial, efilat al nefridiei, poate veni în contact cu o ampulă sanguină, înzestrată cu un organ ciliar. Segmentul următor se termină într-o veziculă excretoare, care se deschide prin porul excretor ventral.

Sistemul nervos (Fig. 50).

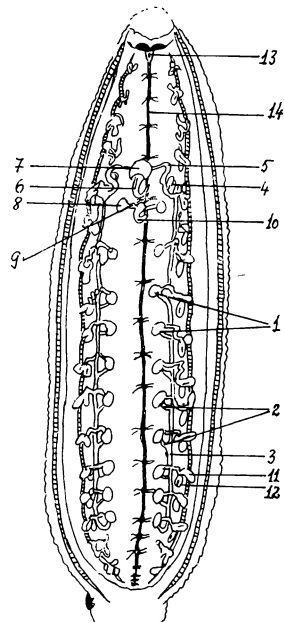


Fig. 50. Hirudo medicinalis — aparatul genital, excretor, sistemul nervos: 1 — testicule; 2 — canale eferente; 3 — canal deferent; 4 — epididim; 5 — canal ejaculator; 6 — penis; 7 — prostată; 8 — ovar; 9 — oviduct; 10 — vagin; 11 — metanefridii; 12 — veziculă excretoare; 13 — ganglioni cerebroizi; 14 — lanţ ganglionar ventral.

Este alcătuit dintr-o pereche de ganglioni cerebroizi, slab dezvoltaţi, legaţi printr-un inel periesofagian de masa ganglionară subesofagiană.

Lanţul ganglionar ventral, inclus în sinusul ventral, este format din 22 perechi de ganglioni. Ultimul ganglion, cel anal, este mai mare.

El provine din sudarea perechilor de ganglioni ai celor 7 segmente posterioare care formează ventuza posterioară.

Fixare : alcool 70° sau formol 4%.

Montare : pe o placă de sticlă, în borcane anatomice, cu lichidul conservant.

1.8.1. METODE DE COLECTARE, PREPARARE

Colectarea formelor bentonice *(Polychete, Oligochete)* se face cu draga tîrîtă mult timp pe fundul apelor ; trierea se face prin site cu ochiuri de diferite mărimi. Se pot spăla de asemenea algele, scoicăria și pietrișul de la dragaj.

Speciile pelagice (adulții și larvele Polychetelor) se colectează cu fileul planctonic, mai ales noaptea la lumină artificială.

Oligochetele tericole cunoscute sub numele de „rîme" sau „viermii pămîntului" sînt căutate în biotipul lor preferat : soluri umede, chiar puternic acide, dar nu sărate. Ele sapă galerii în sol, bușteni putrezi, frunzarul pădurilor. Se pot colecta tot timpul anului, exceptînd iarna.

În laborator ele pot fi menținute timp îndelungat în vase de pămînt sau lădițe de lemn cu pămînt umed și gras. Se hrănesc în special cu zarzavaturi tocate.

Hirudineele se colectează cu plase cu ochiuri dese sau filee. Probele, bogate în plante acuatice, aduse în laborator sînt lăsate să stea cîtva timp liniștite. Se triază și se separă pe specii. Plantele acuatice pot fi spălate bine în acvarii sau vase de sticlă mari, hirudineele fiind colectate apoi cu o pensă.

Formele de apă dulce se pot colecta și cu o pensă sau o pensulă de pe partea inferioară a frunzelor plantelor plutitoare. În laborator se țin în acvarii acoperite, departe de sursa de căldură.

Studiul pe viu este necesar pentru observarea unor detalii de morfologie externă, culoare etc. Oligochetele limicole, în special, datorită transparenței lor, se studiază foarte ușor pe viu.

Anestezia recomandată pentru evitarea contractării corpului și încetinirea mișcărilor este operațiunea premergătoare fixării. La Polychete se împiedică ruperea corpului și apendicelor prin anestezie în apă de mare progresiv alcoolizată de la 1—10%. La Oligochetele limicole se practică anestezia cu alcool diluat sau cocaină, iar la cele terestre cu alcool 5°—10°, cloroform sau eter.

Hirudineele fiind excesiv de contractile, se anesteziază cu cloroform, sifon la ghiață sau alcool picric (alcool etilic 10°, acid picric 0,1% părți egale), întinzîndu-le cu penseta și pensula după ce și-au relaxat musculatura.

Soluțiile fixatoare utilizate sînt :

— lichidul lui Perenyi (100 cc acid azotic 10%, 75 cc soluție apoasă de acid cromic 0,5%, 75 cc alcool 70°—90°), timp de 30 minute — 12 ore, spălare cu alcool 70° sau

— lichidul cromo-acetic (200 cc apă distilată, 1 g acid cromic, 70 cc acid acetic), timp de 2—3 ore, spălare repetată cu alcool 70°, pentru *Polychete ;*

— sublimat acetic sau alcoolic pentru Oligochete și

— amestecul format din 20 cc sublimat apos concentrat, 20 cc formol 4%, 1 cc acid acetic glacial timp de 2—24 ore, după mărime, urmînd spălarea cu alcool iodat, pentru *Hirudinee*.

Se conservă în alcool 70° *(Polychete, Oligochete, Hirudinee)* sau formol 5% *(Oligochete)*. Hirudineele se pot conserva și în formol 5% zaharat, iar Polychetele într-un amestec de glicerină și alcool 70°, părți egale.

Exemplarele bune pentru colecții, se montează pe o placă pe sticlă, legîndu-se cu un fir de aţă în cîteva locuri și se introduc în borcane anatomice cu lichidul conservant. Placa de sticlă se fixează la capete cu dopuri de plută sau cauciuc. Se pune capacul, băşica de bou, emailacul, eticheta.

În acelaşi mod se fixează și disecţia la Hirudo.

Pentru colorarea exemplarelor mai mici în toto se recomandă carminul boracic alcoolic *(Polychete, Oligochete, Hirudinee)* ca și carminul alunat *(Polychete)* și hemalaunul acid *(Oligochete)*. Se diferenţiază, deshidratează și se montează în balsam de Canada.

Parapodele și cheţii se montează în glicerină sau glicerină gelatinată, între lamă și lamelă.

Pentru toate Annelidele, soluţiile cele mai des întrebuinţate în fixarea histologică sînt :

— picroformolul acetic (Bouin)
— amestecul Duboscq-Brasil
— amestecul Zenker.

La acestea se adaugă sublimatul acetic *(Oligochete, Hirudinee)* și alcoolic *(Hirudinee)*.

Menţionăm faptul că înaintea fixării histologice, Polychetele trebuiesc ţinute cîteva zile în cristalizoare curate pentru evacuarea nisipului din intestin, iar rimele între hîrtii de filtru, cîrpe umede sau hrănite cu cicoare pentru eliminarea pămîntului din intestin care la secţionare ar deteriora briciul microtomului.

Tratarea secţiunilor se face după tehnicile histologice cunoscute.

1.9. ÎNCRENGĂTURA ARTROPODA

Protostomieni cu simetrie bilaterală, segmentare heteronomă și exoschelet chitinos. Corpul împărţit în trei regiuni : cap, torace și abdomen. Apendicele perechi în general segmentate. Cavitatea corpului un mixocel. Sistemul nervos scalariform, cu creier și lanţ ganglionar ventral care prezintă diferite trepte de condensare. Aparatul circulator deschis. Respiraţia branchială *(Crustacei)*, tracheană *(Insecte, Miriapode*, parte din *Arachnide)* și prin pulmotrachei *(Arachnide)*. Excreţia prin metanefridii modificate. Sexe separate.

Încrengătura cu cel mai mare număr de specii, răspîndite în toate mediile.

Tip de structură :

— *Araneus diademata* (Subîncrengătura Chelicerata, Clasa Arachnida)
— *Astacus leptodactylus* (Subîncrengătura Mandibulata, Clasa Crustacea)

— *Lithobius fortificatus* (Subîncrengătura Mandibulata, Clasa Chilopoda)

Araneus diadematа (= Epeira diadematа, păianjenul cu cruce) se colectează cu uşurinţă în lunile august şi septembrie. Îl căutăm în locurile retrase din grădini, parcuri, păşuni, locuinţe vechi, străşini etc. Îşi ţese o pînză fină verticală, sub formă de roată, cu raze şi fir spiral.

Prezintă dimorfism sexual exprimat în special prin dimensiunile mai mari ale femelelor, lungimea picioarelor la masculi şi comportament.

Morfologia externă. Vom prezenta femela, care mai mare, măsoară între 20—25 mm lungime. Culoarea femelei variază de la gălbuie spre roşie şi brună pînă la neagră. Tegumentul este acoperit cu peri, unii fiind lungi şi fini, cu rol senzorial, iar alţii sînt rigizi. Corpul este constituit dintr-un cefalotorace sau prosomă şi abdomen sau opistosoma, legate între ele printr-un pedúncul sau peţiol îngust care provine din transformarea primului segment abdominal. Prosoma (Fig. 51) este ovală; dorsal prezintă un scut, iar ventral o placă sternală. Pe scutul dorsal, în regiunea anterioară a prosomei se găsesc 8 oceli : 4 mediani şi 4 laterali. În partea anterioară a plăcii sternale se găseşte orificiul bucal.

Prosoma poartă 6 perechi de apendice (Fig. 51). Chelicerele sînt biramate formate dintr-un articol bazal sau tija prevăzută cu dinţi chi-

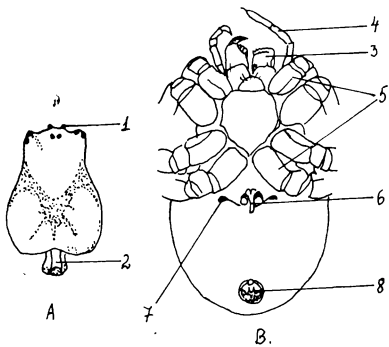


Fig. 51. Araneus diadematus; A — prosoma, dorsal; B — vedere ventrală : 1 — oceli; 2 — peţiol; 3 — chelicere; 4 — pedipalpi; 5 — apendice ambulatoare; 6 — epigină; 7 — stigme; 8 — filiere.

tinoşi şi un jgheab mic. Al doilea articol, în formă de cîrlig mobil, în repaus se aplică pe tijă, pătrunzînd în jgheabul acesteia ca lama unui briceag în prăsele. În fiecare chelicer există cîte o glandă cu venin.

Pedipalpii sau palpii maxilari sînt formaţi din 6 articole : coxa, trochanter, femur, patella, tibia şi tars. Coxa prezintă o lamă maxilară bine dezvoltată a cărei margine internă este dinţată şi serveşte la sfărîmarea hranei. La femelă tarsul se termină cu o ghiară. La mascul, tarsul serveşte ca organ de acuplare.

Picioarele ambulatoare, în număr de 4 perechi, sînt alcătuite din același număr de articole ca și pedipalpii, însă între tibie și tars apare un articol suplimentar, bazitars. Tarsul se termină cu 2 ghiare puternice, îndoite, înarmate cu dinți. La baza acestor ghiare mai există o a treia mai mică, îndoită ca un cîrlig și o pereche de peri pectinați cu rol în țesutul pînzei.

Opistosoma ovală, globuloasă, are tegumentul mai moale decît al prosomei. Pe fața dorsală prezintă pete albe dispuse într-un desen aproximativ în formă de cruce. Acestea sînt de fapt diverticule intestinale cu cristale de guanină.

Ventral-anterior se disting trei orificii : median, orificiul genital iar lateral, 2 orificii respiratorii : stigmele respiratorii. La femelă, orificiul genital este acoperit de o placă chitinoasă, mai mult sau mai puțin groasă, epigina, cu importanță în determinarea speciilor.

La extremitatea posterioară sînt situate 3 perechi de mameloane conice, chitinizate, numite filiere. Filierele sînt apendice abdominale rudimentare ce aparțin sgmentelor X și XI. 4 filiere sînt mari și laterale, 2 mici, mediane, posterioare. Extremitățile lor prezintă o mulțime de pori, ca o placă ciuruită de strecurătoare, prin care ies firele de mătase, secretate de glandele sericigene. Între filiere, pe o mică ridicătură, se află orificiul anal, iar înaintea lor, median ,un mic orificiu, al stigmei tracheene.

Disecția (Fig. 52) se face sub apă. În prealabil se anesteziază păianjenii cu eter sau cloroform.

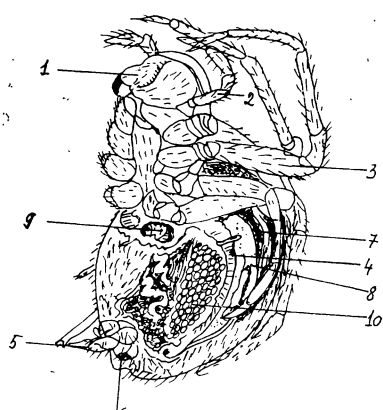


Fig. 52. Araneus diadematus — disecție : 1 — chelicere ; 2 — pedipalpi ; 3 — apendice ambulatoare ; 4 — intestin mediu ; 5 — filiere ; 6 — anus ; 7 — nepatopancreas ; 8 — inima ; 9 — plămîn ; 10 — ovar.

Se taie dorsal opistosoma și prosoma pe una din laturile lor sau se ridică ca un capac tegumental dorsal. După desfacerea cavității corpului se observă organizația internă.

Sistemul digestiv începe cu orificiul bucal încadrat de o buză superioară moale și una inferioară puternic chitinizată precum și de lamele maxilare ale pedipalpilor. Urmează apoi un faringe musculos, un esofag îngust. Acesta, după ce străbate masa nervoasă și se dilată într-o guşă sau stomac sugător, se continuă cu intestinul mediu, care dă de o parte și de alta cîte un diverticul care se îndreaptă spre partea anterioară a prosomei. Acesta la rîndul lui dă 5 cecuri prosomiene, din care 4 pătrund în bazele picioarelor. Intestinul mediu trece în opistoma prin peţiol, se îndreaptă posterior, terminîndu-se într-un scurt rect, ce comunică cu exteriorul prin orificiul anal. Înaintea rectului se găseşte o dilatare, cec rectal sau cloac, unde se deschid tubii lui Malpighi. Intestinul mediu dă diverticule ramificate arborescent constituind „hepatopancreasul opistosomal" care umple cavitatea corpului.

Sistemul circulator : inima tubulară, contractilă, situată în regiunea anterioară a opistomei, prezintă ostiole perechi. Anterior și posterior, din ea se detaşează o aortă anterioară și respectiv o aortă posterioară.

Sistemul respirator este reprezentat prin 2 plămîni și trachei. Plămînii se deschid prin stigme, de o parte și alta a orificiului genital, iar tracheile printr-o singură stigmă înaintea filierelor.

Sistemul genital. Sexele separate. Aparatul genital mascul este format din 2 testicule, 2 canale deferente răsucite, unite apoi într-un conduct comun ce se deschide printr-un orificiu median ventral, situat anterior pe opistosomă.

Aparatul genital femel cuprinde 2 ovare, 2 oviducte, un uter, un vagin și numeroase spermateci. Orificiul de pontă, median, ventral, impar este situat în partea anterioară a opistosomei. Pe fiecare latură a acestuia se află cîte un orificiu de împerechere, ce corespunde rezervoarelor spermatecilor.

Sistemul nervos este puternic concentrat. Ganglionii cerebroizi sînt formaţi din protocerebron și tritocerebron. Nu au deutocerebron, lipsă constantă la arachnide. Ganglionii lanţului nervos ventral sînt contopiţi într-o masă nervoasă ce înconjoară esofagul, de unde pleacă nervi la toate organele exceptînd ochii.

Astacus leptodactylus (racul de rîu, Fig. 53—57)

Corpul alcătuit din 19 segmente este împărţit în două regiuni : *cefalotoracele*, cuprinzînd capul (5 segmente + acronul) și toracele (8 segmente), *abdomenul* din 6 segmente plus telsonul (Fig. 53).

Tegumentul este puternic mineralizat.

Carapacea cefalică fuzionează dorsal cu segmentele toracice a căror delimitare se păstrează numai ventral. Pe cefalotorace se disting 3 şanţuri care îl separă în mai multe zone. Un şanţ transversal, în formă de arc, şanţul *cervical* sau *nucal*, separă regiunea cefalică, *cefalostegit*, de rest. Două şanţuri longitudinale, care merg de la cel transversal către marginea posterioară a carapacei și se menţin întrucîtva paralele între ele, şanţurile *branchio-cardiace*, împart regiunea toracică în trei zone :

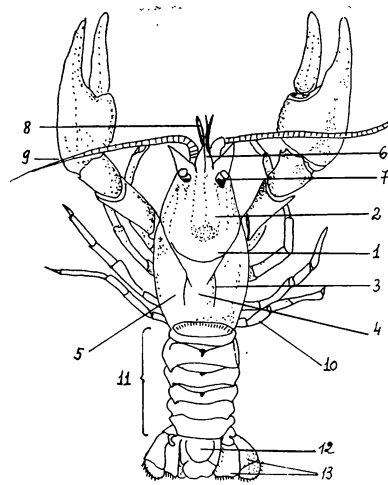


Fig. 53. — Astacus leptodactylus — morfologie externă : 1 — șanț cervical ; 2 — cefalostegit ; 3 — șanț branchio-cardiac ; 4 — cardiostegit ; 5 — branchiostegit ; 6 — rostrum ; 7 — ochi compuși ; 8 — antenula ; 9 — antena ; 10 — apendice toracice locomotoare ; 11 — segmente abdominale ; 12 — telson ; 13 — uropode.

una centrală, *cardiostegit*, (acoperă inima) și două laterale, *(branchiostegite* (acoperă cavitățile branchiale în care sînt adăpostite branchiile).

Anterior cefalostegitul se prelungește cu un rostru lung, ascuțit și imobil, la baza căruia proemineză pedunculii ochilor compuși. De o parte și de alta a rostrului, se observa antenele, dar între ele cele două antenule. Pe laturile cefalotoracelui, din privire dorsală, se văd cele 5 perechi de apendice locomotoare.

Abdomenul este format din 6 segmente, mobil articulate între ele. Mobilitatea segmentelor adbominale este dată de cuticula moale dintre ele. Abdomenul se îndoaie cu ușurință numai spre partea ventrală. Telsonul în forma de lamă. Ultima pereche de apendice adbominale numită *uropode*, încadrează telsonul și formează împreună o *înotătoare codală*

Apendicele sînt în număr de 19 perechi și anume : 5 *cefalice*, 8 *toracice* și 6 abdominale (Fig. 54).

Apendicele biramat *primitiv*, de la care prin modificări în legătură cu funcțiile îndeplinite, deriva toate celelalte, este format din : *protopodit* alcătuit din două articole : un *coxopodit* cu care se articulează de corp și un *bazipodit*, de care se înseră cele două ramuri. *endopoditul*, către interior și *exopoditul*, către exterior.

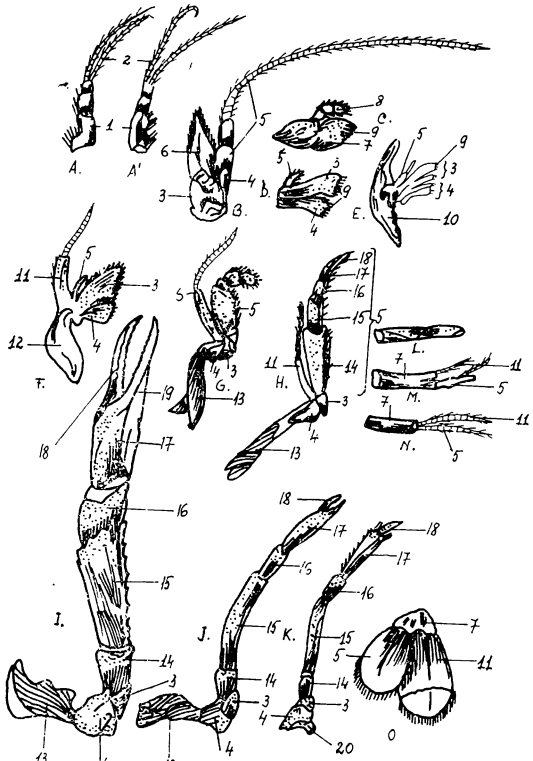


Fig. 54. Astacus leptodactylus — apendicele corpului: A—A' antena I (antenula); B — antena II (antena); C — **mandibula**; D — maxila I (maxilula), E — maxila II (maxila); F — **maxilipedul I**; G — **maxilipedul II**; H — maxilipedul III; I — pereiopodul I; J — pereiopodul II; K — pereiopodul V; L — gonopod I; M — gonopod II; N — **pleopod III**; O — uropod: 1 — bază triarticulată; 2 — flagel; 3 — bazipodit; 4 — coxopodit; 5 — endopodit; 6 — scafocerit; 7 — protopodit; 8 — palp mandibular; 9 — endite masticatoare; 10 — scafognatit; 11 — exopodit; 12 — epipodit; 13 — podobranchie; 14 — ischiopodit; 15 — meropodit; 16 — carpopodit; 17 — propodit; 18 — dactilopodit; 19 — apofiză; 20 — orificiul genital mascul.

I. *Apendicele cefalice,* după funcțiile lor, se împart în *sensoriale* și *masticatoare.*

a) *apendicele cefalice sensoriale* — 2 perechi

1. *Antenula* sau *antena I* este formată dintr-o bază triarticulată, pe care se inseră doi flageli multiarticulați, care nu au valoare de exopodit și endopodit pentru că la larvă, acest apendice este uniramat. Pe fața ventrală a articolului bazal al protopoditului, se află un organ statoacustic (statocist). Antenula este un organ tactil inervat de ganglionii cerebroizi.

Ea este homologă palpilor de la Annelide.

2. *Antena* sau *antena II,* este constituită dintr-un protopodit, pe al cărui coxopodit, pe o proeminență conică, se află orificiul glandei verzi. Exopoditul este redus la un solz, numit solzul antenei sau *scafocerit.* Endopoditul are două articole bazale, mai mari, și un flagel lung, multiarticulat.

b) *apendicele cefalice masticatoare* — 3 perechi

1. *Mandibula* este scurtă, puternic chitinizată. Protopoditul este o piesă unică, cu un endit masticator. Pe protopodit, se inseră un palp mandibular, format din 3 articole, homolog cu endopoditul. Nu are exopodit.

2. *Maxila I* este o piesă lamelară, delicată. Coxopoditul și bazipoditul prezintă pe marginea lor internă endite masticatoare, lățite, prevăzute cu peri. Endopoditul mic, format dintr-un singur articol. Exopoditul absent.

3. *Maxila II* este subțire, lamelară. Protopoditul, prezintă coxopoditul și bazipoditul, fiecare subdivizat în două. Endopoditul este mic și ascuțit. Exopoditul și epipoditul lamelar formează o piesă unică numită *scafognatit,* indispensabil în viața racului. Dacă se taie scafognatitul, racul moare sufocat.

II. *Apendicele toracice* (= pereiopode) după funcțiile pe care le îndeplinesc se împart în masticatoare și locomotoare

a) *apendice toracice masticatoare* — 3 perechi

Trei perechi de maxilipede :

1. *Maxilipedul I.* Coxopoditul și bazipoditul, au cîte un endit masticator, lamelar, numit *gnatit.* Endopoditul este mic, format din două articole. Exopoditul bine dezvoltat, prezintă un articol bazal și un flagel multiarticulat. Pe partea externă a protopoditului se găsește o expansiune membranoasă, ca o lamă, numită *epipodit,* care reprezintă o podobranchie rudimentară.

2. *Maxilipedul II* este mai mare, mai puternic și mai complicat. Coxopoditul scurt, lat, poartă pe partea externă epipoditul transformat în podobranchie. La încheietura piciorului este o artrobranchie. Pe bazipodit, se articulează exopoditul, format dintr-un articol bazal și un flagel multiarticulat și endopoditul bine dezvoltat, cu articole diferențiate. Pornind de la bază către vîrf, aceste articole sînt : *ischiopodit, meropodit, carpopodit, propodit* și *dactilopodit.*

3. *Maxilipedul III.* Foarte bine dezvoltat, cu aceeași conformație ca și maxilipedul II.

b) *apendicele toracice locomotoare* — 5 perechi

La ele, exopoditul a dispărut, iar endopoditul, bine dezvoltat, este format din cele cinci articole de la maxilipedele II și III. Pe protopodit, se găsesc filamentele coxale, care opresc pătrunderea firelor de nisip în cavitatea branchială.

Perechea I, cea mai bine dezvoltată, este prehensilă. Protopoditul format din coxo- și bazipodit, poartă o podobranchie și două arthrobranchii. Propoditul, puternic lățit, are o apofiză terminală, lungă, care împreună cu dactilopoditul formează cleștele.

Perechea II și III au aceeași conformație cu deosebirea că au cleștele mai mic. Pe coxopoditele perechii a III-a, se află orificiile genitale femele.

Perechea IV și V au propoditul lipsit de apofiză iar dactilopoditul cu aspect de gheară nu mai formează cleștele. Perechea a V-a de apendice toracice locomotoare prezintă numai o pleurobranchie. Pe coxopoditele perechii a V-a sînt plasate orificiile genitale mascule.

III. *Apendicele abdominale* (⇒**pleopode**).

Structura lor se diferă la cele două sexe.

La *mascul:* Primele două perechi sînt transformate în *gonopode,* servind în împerechere (conducerea spermei).

Gonopodul I este ca un stilet, în vîrful căruia se găsește o lamă răsucită ca un cornet, care formează un canal deschis.

Gonopodul II este biramat. Protopoditul este o piesă unică, rezultată din fuzionarea celor două articole, coxo- și bazipodit. Exopoditul este scurt, endopoditul chitinos, răsucit în formă de cornet și cu un flagel multiarticulat.

Perechile III — V sînt tipic biramate. Protopoditul dintr-un coxopodit scurt, pe care se inseră un exo- și endopodit multiarticulat, cu peri.

Perechea VI sînt *uropode,* cu aceiași constituție la ambele sexe. Protopoditul este scurt și nedivizat. Endopoditul lat, prevăzut cu peri, iar exopoditul este lung și subdivizat. Toate piesele constitutive ale acestui apendice sînt lățite, lamelare.

La *femelă,* prima pereche este rudimentară.

Perechile II—VI (inclusiv uropodul) sînt ca perechile III—VI de la mascul. Apendicele II—V servesc, la femelă, pentru menținerea pontei.

Apendicele la *Astacus* sînt detașate, cu grijă, de pe o parte a animalului, cu o pensă anatomică, pornind de la ultimul pereipod către apendicele cefalice. În acest mod se înlătură ruperea unor articole bazale. Ele sînt așezate în ordinea lor, avînd alături racul de unde provin, pe coli de hîrtie, carton, cutii de lemn, sau plastic. Se etichetează.

Pot fi executate preparate macroscopice umede cu morfologia externă a racului.

De aceea racii formolizați, avînd apendicele locomotoare bine întinse, se fixează pe o placă de sticlă și se introduc în borcane de colecție cu lichidul conservant.

Se închid la fel ce celelalte preparate.

Organizația internă se studiază pe disecție, care se face sub apă. Animalul se cloroformizează. Apoi se așează într-un castron de disec-

ție, cu fața dorsală în sus, fixîndu-l cu ace de gămălie în telson și clești.

Pentru studiul organizației interne trebuie să se descopere partea dorsală a animalului. Pentru acestea trebuiesc efectuate, cu ajutorul unei foarfeci, următoarele incizii :

— se înlătură membrana moale care leagă cefalotoracele de primul inel abdominal urmînd liniile 1, 1 (Fig. 55).

— se detașează apoi, dinapoi înainte, după traectul liniilor 2,2 și 3,3 părțile laterale ale cefalotoracelui.

— se înlătură lama mediană a cefalotoracelui prin 2 mici tăieturi transversale 4,4.

— se secționează succesiv, dinainte înapoi, partea dorsală a fiecărui inel abdominal. Astfel se observă, în ordinea dispoziției lor, aparatul circulator, genital, digestiv, excretor și sistemul nervos (Fig. 55—56).

Aparatul circulator (Fig 56).

Partea cea mai caracteristică a acestui aparat este reprezentată prin vasul dorsal, a cărui regiune mijlocie este diferențiată într-o inimă. Ea are o formă poligonală și prezintă 6 orificii numite ostii : 2 dorsale, 2 laterale și 2 ventrale.

Partea din vasul dorsal, situat înaintea inimii, constituie aorta anterioară sau artera oftalmică care irigă ochiul, iar dinapoia inimii formează aorta posterioară sau artera abdominală dorsală cu ramificații care se distribuie la mușchii abdominali.

De pe cele două laturi ale aortei anterioare se detașează 2 artere antenare, care conduc sîngele la apendicele cefalice senzoriale, partea anterioară a tubului digestiv și 2 artere hepatice care irigă hepatopancreasul.

Din aorta posterioară se desprinde artera sternală cu direcție verticală. Această arteră trece pe partea dreaptă a intestinului, atinge lanțul ganglionar, pe care îl traversează între perechea a treia și a patra de ganglioni toracici, după care dă un ram anterior (artera maxilipedioasă sau artera sternală ventrală) și un ram posterior (artera abdominală posterioară).

Din aceste două ultime artere se desprind vase care irigă organele din regiunea ventrală și apendicele.

Sîngele trece din artere în sinusurile sau lacunele sanguine din diferitele părți ale corpului. Dirijat către lacunele din interiorul pereiopodelor locomotoare și de aici la branchii prin vase branchiale aferente, unde se oxigenează, sîngele este condus prin vase branchiale eferente în pericard, și de aici pătrunde în inimă prin ostii.

Se poate urmări aparatul vascular al racului injectînd porțiunea sa arterială cu un lichid colorat : soluție de bicromat de potasiu 5% cu acetat de plumb 3%, căreia în momentul folosirii i se adaugă o soluție de gelatină sau o soluție fluidă de gumă arabică combinată cu o culoare de acuarelă.

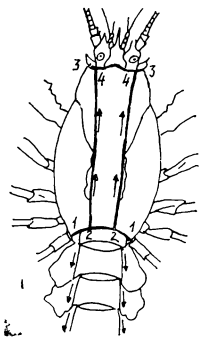


Fig. 55. Diagrama care indică locul și direcția incizиilor efectuate pe fața dorsală a raculuı pentru a evidenția organele interne.

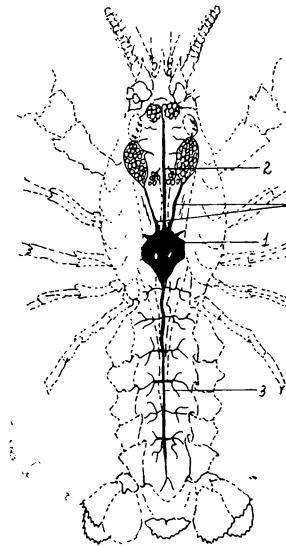


Fig. 56. Astacus leptodactylus — aparatul circulator : 1 — inimă ; 2 — artera oftalmică ; 3 — artera abdominală dorsală ; 4 — artere hepatice.

Injecția se face direct în inimă. Pentru descoperirea ei, la un animal ușor anesteziat, se taie cefalotoracele în lungul celor 2 șanțuri branchiocardiace, dinapoi înainte, pînă la șanțul cervical, fiind secționat apoi și acesta transversal. Se descoperă cavitatea pericardică în centrul căreia bate inima. Se introduce canula pentru injecție în inimă, fie prin unul din orificiile dorsale, fie prin peretele său. Injecția se face încet, pentru ca presiunea să nu spargă vasele și să nu se introducă aer. Inima pulsînd ritmic, răspîndește lichidul colorat și evidențiază aparatul vascular al raculuı.

Aparatul genital mascul (Fig. 57) este alcătuit dintr-un testicul trilobat în formă de Y. Prezintă 2 lobi anteriori, simetrici și un lob median, posterior. De fiecare parte, de la limita dintre lobii anteriori cu cel posterior pornește cîte un canal deferent, lung, cu numeroase circumvoluțiuni. Ele conduc la cele două orificii sexuale mascule, situate

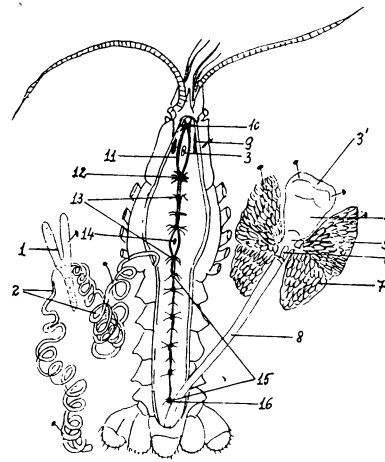


Fig. 57. Astacus leptodactylus — organizația internă la mascul : 1 — testicul ; 2 — canal deferent ; 3 — esofag ; 3' — stomac ; 4 — cardia ; 5 — pilor ; 6 — intestin mediu ; 7 — hepatopancreas ; 8 — intestin posterior ; 9 — glanda verde ; 10 — creer ; 11 — inel perisofagian ; 12 — masă ganglionară subesofagiană ; 13 — ganglioni toracici ; 14 — artera sternală ; 15 — ganglioni abdominali ; 16 — ganglionul anal.

pe articolul bazal al perechii a cincea de apendice toracice locomotoare.

Aparatul genital femel. Ovarul trilobat, o masă de culoare portocalie-brună, este situat deasupra stomacului. Din regiunea mijlocie a lui, simetric, se desprind 2 oviducte scurte, cu deschiderea pe coxopoditele perechii a treia de apendice locomotoare.

După observarea poziției ovarului sau testicululuí, se taie conductul glandei (canal deferent sau oviduct), obișnuit de pe dreapta. Se detașează gonada din poziția inițială, fixîndu-se în ace, în vasul de disecție, pe partea stîngă.

Aparatul digestiv (Fig. 57). Începe cu orificiul bucal înconjurat de aparatul masticator. Esofagul care urmează, cilindric, foarte scurt și aproape vertical se continuă cu stomacul. Acesta este divizat într-un stomac anterior sau „cardiac" și un stomac posterior sau „piloric". Stomacul cardiac sau masticator este căptușit cu chitină. În porțiunea anterioară a stomacului cardiac se găsesc 2 concrețiuni calcaroase, așa numite gastrolite. Ele conțin rezerve de carbonat de calciu folosite pentru impregnarea cu calciu a noului înveliș chitinos după năpîrlire.

În partea posterioară, stomacul masticator prezintă un sistem complicat de trabecule și proeminențe prevăzute cu dinți, ceea ce reprezintă așa-numita morișcă gastrică, folosită pentru triturarea hranei. Dintre piesele mai importante care intră în constituția ei menționăm : 2 dinți laterali, unul drept, altul stîng, la rîndul lor prevăzuți cu dințișori chitinoși ; un dinte median foarte puternic și complicat susținut de un dublu sistem de pîrghii ; 2 dinți mici situați în urma dinților laterali, fiecare pe cîte o proeminență.

Se pun în evidență prin secționarea feții dorsale a stomacului cardiac.

Porțiunea pilorică a stomacului · folosește la presarea și filtrarea particulelor nutritive.

Intestinul mediu, endodermic, este foarte scurt. Simetric, prezintă 2 orificii ale glandei anexe, hepatopancreasul, care ocupă aproape toată cavitatea toracică. Este format dintr-un număr considerabil de tuburi sau diverticule. Se prezintă sub forma a 2 mase simetrice, divizată fiecare în 3 lobi : unul anterior, mijlociu și posterior. Fiecare lob prezintă un conduct principal în care se deschid toate tuburile care-l compun. Conductele celor 3 lobi, de aceeași parte, se unesc pentru a forma un canal lung care se deschide în intestinul mijlociu.

Intestinul posterior, ectodermic, străbate abdomenul și se deschide prin anus, situat ventral, pe telson.

Odată evidențiat tubul digestiv, se etalează în castronul de disecție, pe partea dreaptă a animalului, prinzîndu-se în ace.

Se secționează la nivelul esofagului.

Aparatul excretor (Fig. 57) este reprezentat printr-o pereche de glande antenare sau glande verzi (metanefridii modificate), situate în partea anterioară a cefalotoracelui, înaintea și pe laturile stomacului. Fiecare glandă este formată dintr-un rinichi, vezică urinară, canal excretor care se deschide ventral, pe segmentul bazal al antenei.

Sistemul nervos (Fig. 57). După etalarea organelor din cavitatea corpului și după îndepărtarea mușchilor toracici și abdominali, pe fundalul disecției rămîne *sistemul nervos.*

Este format dintr-un creier situat anterior, dorsal. Printr-un inel periesofagian creierul se leagă de masa ganglionară subesofagiană, care rezultă din contopirea a trei perechi de ganglioni cefalici și trei perechi toracici. Urmează lanțul ganglionar ventral alcătuit din 5 perechi de ganglioni toracici și 6 perechi abdominali. Doi ganglioni ai fiecărei perechi sînt strînși legați pe linia mediană și formează o masă ganglionară unică. Perechile de ganglioni sînt unite între ele prin conective longitudinale, paralele. Între perechile III—IV conectivele sînt îndepărtate lăsînd să treacă artera sternală. Perechile IV—V sînt apropiate.

Ultimul ganglion abdominal, anal, este mai mare.

Perechile de ganglioni și conectivele longitudinale se pot pune bine în evidență picurînd cu o pipetă acid azotic sau alcool 70° timp de 10 minute pînă la 12 ore.

Fixare : alcool 70° sau formol 4%.

Montare : pe o placă de sticlă, în borcane anatomice de colecție. Se etichetează.

Lithobius forticatus (urechelnița, Fig. 58—59)

Chilopod comun în țara noastră, trăind pe sub bușteni putreziți, pietre, frunzarul pădurilor.

Morfologie externă (Fig. 58 A). Corpul lung, 18—35 mm, colorat de la brun-roșcat pînă la castaniu întunecat, este format din cap și trunchi.

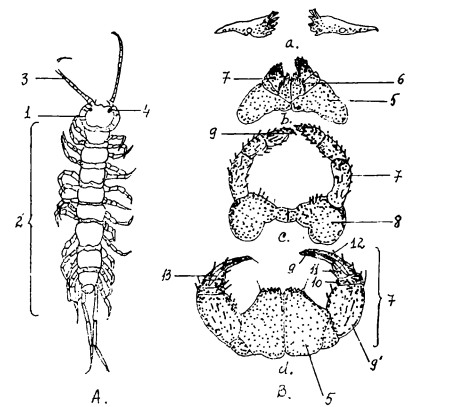


Fig. 58. Lithobius forficatus; A — morfologie externă; B — aparatul bucal; a. mandibula; b. maxila I; c. maxila II; d. forcipul: 1 — cap; 2 — trunchi; 3 — antene; 4 — ochi; 5 — coxosternit; 6 — lobi coxali; 7 — telopodit; 8 — sincoxosternum; 9 — ghiare; 9' trochanter + prefemur; 10 — femur; 11 — tibia; 12 — tars; 13 — glanda cu venin.

Capul turtit dorso-ventral, are antene lungi, multiarticulate și oceli numeroși (20—40) dispuși în 5—8 rînduri orizontale.

Ventral se găsește orificiul bucal înconjurat de apendicele bucale. Mandibulele (Fig. 58 B) sînt formate dintr-o piesă puternică chitinizată prevăzută intern cu dinți și lame pectinate. În urma mandibulelor se găsesc cele două perechi de maxile.

Perechea I de maxile este constituită dintr-un coxosternit divizat sau nu, 2 lobi coxali triunghiulari scurți și telopoditele cu cîte 2 articole.

Perechea a II-a este alcătuită dintr-un sincoxosternum pe care se articulează telopoditele formate din 4 articole puțin turtite. Ultimul articol se termină cu o ghiară simplă. Cele 2 perechi de maxile sînt lipite între ele.

Trunchiul, turtit dorso-ventral, este format din 18 segmente. Primul segment al trunchiului îngust, poartă apendice numite forcipule; urmează segmente scurte care alternează cu segmente lungi, excepție segmentele VIII—IX care au aceeași lungime.

Forcipulele sînt formate dintr-un coxosternit cu sau fără șanț median longitudinal prevăzut anterior cu dinți. Pe acesta se articulează apendicele propriu-zise constituite din cîte 4 articole. Primul articol rezultă din fuzionarea trochanterului cu prefemurul. Următoarele 2 ar-

ticole : femurul și tibia sînt mai scurte. Ultimul articol, tarsul este lung și se termină cu o ghiară puternic chitinizată, arcuită și ascuțită în vîrful căreia se deschide cîte o glandă cu venin.

Fiecare segment este constituit dintr-un tergit și un sternit, legate între ele prin pleure. Pe ultimele se găsesc stigmele respiratorii și tot pe ele se articulează apendicele. Cu excepția ultimelor segmente, toate celelalte poartă cîte o pereche de apendice. La un apendice se distinge coxa și telopoditul format din 6 articole : trochanter, prefemur, femur, tibia, tars și metatars terminat cu gheară.

Perechea a 15-a de apendice este mai lungă. Pe segmentul 17 se deschide orificiul genital, apendicele acestui segment fiind adesea transformate în gonopode. Ultimul segment este redus și poartă orificiul anal.

Disecția (Fig. 59). Se anesteriază animalul cu eter sau cloroform. Se așează apoi într-un castron de disecție cu fața dorsală în sus, fixîn-

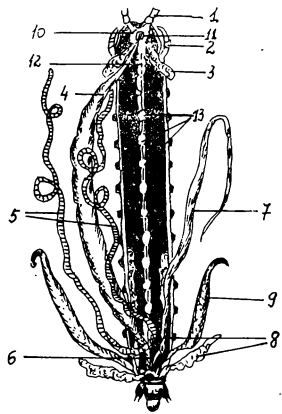


Fig. 59. Lithobius forficatus — disecția mascul : 1 — antene ; 2 — forcipul ; 3 — glande bucale ; 4 — stomac ; 5 — tubii Malpighi ; 6 — intestin p sterior ; 7 — testicul ; 8 — glande anexe ; 9 — vezicula seminală ; 10 — creer ; 11 — inel periesofagian ; 12 — masă nervoasă subesofagiană ; 13 — lanț ganglionar ventral.

du-se prin ace cu gămălie, la cele 2 extremități. Cu ajutorul unei foarfeci fine se incizează tegumentul pe ambele laturi sau pe una din ele, începînd din regiunea posterioară pînă la cea anterioară. Se decupează astfel partea dorsală ca un capac. Astfel, cavitatea corpului deschisă ne permite să observăm organizația internă, care corespunde schemei de structură a unui artropod.

Tubul digestiv, destul de lung începe cu orificiul bucal înconjurat de piesele bucale. În cavitatea bucală care urmează se deschid 1 pereche

de glande bucale. Intestinul mediu este drept, lung de aproximativ același calibru pe toată lungimea sa. Intestinul posterior este întotdeauna scurt și face o îndoitură caracteristică în formă de S. La limita dintre intestinul mediu și posterior se deschid tubii lui Malpighi.

Sistemul circulator este deschis și lacunar, format dintr-un vas de sînge dorsal și ventral. Vasul dorsal sau inima se întinde din segmentul forcipular pînă la ultimul segment purtător de apendice. El este format din 15 ventriculite. Anterior comunică cu sinusul cefalic, posterior cu sinusul posterior.

Sistemul respirator este de tip trachean. Trachea principală se ramifică în trachei secundare și tracheole care nu se anastomozează. Stigmele sînt situate în general, pe pleure.

Sistemul excretor este reprezentat prin tuburile lui Malpighi (o pereche) lungi și înguste, care se întind pînă în regiunea cefalică. Ei reprezintă rinichii de eliminare.

Rinichii de acumulare sînt marcați prin corpii adiposi, mase celulare bogate în lipide și pigmenți cromofili, situați în jurul inimii, al lanțului nervos și pe laturile corpului.

Sistemul genital. Sexele separate. *Aparatul genital mascul* este constituit dintr-un testicul, 2 canale deferente, 1 canal ejaculator (în care se deschid 2 perechi de glande anexe). Ultimul traversează penisul mic, slab chitinizat, în formă de trunchi de con. Orificiul genital este impar, ventral.

Aparatul genital femel este format dintr-un ovar, un oviduct care ajunge într-un atriu genital, deschis la exterior printr-un orificiu impar. Aparatului genital femel i se adaugă 2 receptacule seminale, în care se acumulează spermatozoizii, ca și 2 perechi de glande accesorii cu aspect de ciorchine care secretă coaja oului și o substanță care contribuie la păstrarea vitalității spermatozoizilor.

Sistemul nervos, de tip ganglionar, segmentar, este constituit din ganglionii cerebroizi legați printr-un inel periesofagian de masă ganglionară subesofagiană. Lanțul ganglionar ventral, prezintă cîte o pereche de ganglioni pentru fiecare segment; segmentul anal este lipsit de ganglioni.

1.9.1. METODE DE COLECTARE, CONSERVARE, PREPARARE

Multe arachnide (pseudoscorpioni, araneide, acarieni terestri) se colectează cu ajutorul fileului trecut de mai multe ori pe deasupra ierbii. Proba se pune într-un borcan de sticlă cu eter sau cloroform.

Probe de frunzar aduse în săculețe de pînză se triază la aparatul Tullgren. Animalele mici, greu de colectat cu ochiul liber, cad în vasul cu alcool de sub aparatul de triat.

Se cercetează, de asemenea, zidurile vechi, trunchiurile copacilor, tufișurile, grămezile de pietre, aglomerările de plante uscate, plantele de la marginea apelor, peșterile.

Speciile cu activitate nocturnă se pot prinde noaptea folosind o lanternă.

Pentru araneide, metoda des utilizată este cea a capcanelor tip Barber. Astfel, se îngroapă în pămînt un borcan de sticlă în așa fel încît

deschiderea să fie puțin sub nivelul solului. Se umple borcanul pînă la 1/3 cu formalină 4% și se acoperă cu un pătrat de tablă cu 2 picioare sau o șipcă de lemn, pătrată, sprijinită de pietre, pentru a evita umplerea în caz de ploaie. Într-un loc se pot instala 10—25 capcane la o distanță de 1—5 m una de alta.

Hidracarienii se colectează cu fileul planctonic sau fileul obișnuit.

Căpușele *(Ixodide)* se culeg fie de pe gazdele lor (animalele domestice și sălbatice) fie de pe teren. Mamiferele sau păsările mici se pun fiecare separat în cîte un săculeț de pînză. În laborator se examinează atît animalul cît și conținutul sacilor pentru a strînge căpușele existente.

Colectarea de pe teren se face prin mijloace diferite în funcție de biotop. De pe iarbă și tufișuri căpușele se culeg tîrînd o pînză albă de care ele se prind (metoda Nuttall) sau cu ajutorul unei plăci de placaj îmbrăcată în pînză și susținută cu o coadă (metoda prășitoarei).

Majoritatea arachnidelor se fixează și se conservă în alcool 70°. Speciile capturate se păstrează în tuburi de sticlă mici, cu alcool 70°, închise cu dop de plută sau vată. Se introduc în tuburi etichete cu data și locul colectării. Tuburile se pun în borcane mai mari, închise cu dop rodat, și pline cu alcool 70°.

Hidracarienii se păstrează în soluția Koenike : 30 gr glicerină. 50 gr apă distilată, 5 gr acid acetic glacial.

Căpușele se fixează în apă fierbinte sau alcool 25—30% în care s-au pus cîteva picături de acid sulfuric. Se conservă în alcool 70°, formol 5% (mai puțin propice) sau amestec de formol și glicerină, părți egale.

Pentru clarificare se folosește KOH 10—20% (araneide) sau lichidul Springholz-Schmidt : 50 cc glicerină, 20 cc acid acetic, 10 cc cloroform, 10 cc apă distilată (Ixodide).

Exemplarele mari de scorpioni, araneide, solfuge, etc. pot fi montate în borcane de colecție, executînd preparate macroscopice umede.

Se fac preparate definitive cu stadii larvare și exemplare mai mici, montîndu-se în :

— glicerină gelatinată (pe margine se acoperă lamela cu balsam de Canada sau lac de bitum).

— lactofenol (se înconjoară lamela cu lac de bitum ; se folosește pentru căpușe).

— lichidul Faure.

— lichidul Swann (50 gr cloral hidrat dizolvat în 20 ml apă distilată. Se adaugă 3 gr glicerină și 5 ml acid acetic. Se filtrează prin vată de sticlă ; utilizat pentru căpușe).

— balsam de Canada, după o colorație prealabilă cu carmin boracic alcoolic sau carmin alunat.

Crustaceii sînt extrem de diversificați ecologic. Mara majoritate a lor sînt marini, putîndu-se găsi de la limita de spargere a valurilor pînă la 5000 m adîncime sau în plină mare, unde constituie cea mai mare parte a biomasei planctonului marin *(Copepode, Euphausiacee)*. Multe sînt de apă dulce găsindu-se de la gurile fluviilor pînă la mlaștinile turboase, sau în izvoare, pîraie, lacuri, bălți temporare sau permanente. Unele forme au trecut în mediul freatic și cavernicol *(Isopode, Copepode, Ostracode, Amphipode)*. Speciile terestre *(Isopode)* preferă locurile cu multă umezeală.

CRUSTACEE

Speciile parazite, pe alte animale sau chiar alți crustacei, sînt uneori adînc modificate *(Rhizocephali, Copepode)*. Există și cazuri tipice de simbioză (Paguri cu actinii) sau comensalism *(Decapode cu Copepode, Ostracode* cu *Isopode)*.

Datorită acestui fapt, *metodele de colectare* variază în funcție de modul de viață al diferitelor grupe mari de Crustacei.

Crustaceii legați de substrat, din apele puțin adînci (izvoare, bălți, lacuri, malul mării) se adună fie direct cu mîna și pensa de sub pietre, cioturi, alge, fie trăgînd cu ciorpacul printre plantele de apă sau punînd într-un vas cu formol slab, pietre sau corpuri ce au stat în apă. În ultimul caz se adună *Ostracode, Cladocere, Copepode, Cumacee, Tanaidacee*.

Pentru prinderea formelor mai mari *(Myside, Isopode, Amphipode,* unele *Decapode),* de mică adîncime, se pot folosi voloace dese, iar pentru raci, crabi, chiar năvoade pescărești.

Crustaceii planctonici *(Cladoceri, Copepode)* se colectează cu fileul plactonic sau ciorpacul de pe mal sau din barcă. Tot cu ciorpacul se adună și Phylopodele, locuitori ai apelor mici periodice.

Pentru speciile de fund, mai adînc, bogat în prundiș sau mîl, se folosește draga cu greblă, tip Băcescu, care se trage din barcă pe fundul apei și cu ajutorul căreia se obțin probe calitative bentonice.

Probe cantitative bentonice se colectează cu filee speciale tip Hensen sau tip Botnariuc (fileu reversibil).

Numeroși crustacei se obțin prin spălarea puternică a tufelor de alge *(Ceramium, Laurencia, Cystoseira, Dasya)* sau a pietrelor, în vase sau acvarii mari cu apă de mare.

Unii crustacei, *Copepode, Cumacee, Miside, Isopode, Amphipode,* care execută migrații pe verticală, urcînd noaptea la suprafață, se prind exclusiv noaptea, cu filee planctonice. Pentru aceasta se trage cu un fileu, confecționat din pînză deasă de mătase cu laturile ochiurilor sub 0,5 mm, în urma bărcii (pe mare, lacuri), sau se agață acest fileu ori draga la suprafață (rîuri) pentru ca apa să se scurgă prin ele în timpul nopții. De aici și necesitatea pescuitului de noapte, cu sau fără lumină. Astfel, cantități apreciabile de Decapode se capturează prin dragaj mai ales de noapte. Pagurii se prind la dragaje de zi.

Racii de rîu și mulți crabi se prind direct cu mîna din adăposturi, pe sub maluri, ridicînd pietrele micilor pîraie carstice sau cu ciorpacul cu nadă (carne, ficat) și la coșuri sau vîrșe.

Pachygrapsus se prinde noaptea, cu lanterna, cînd se găsește pe uscat, deasupra stîncăriilor sau chiar pe nisip, iar *Eryphia* primăvara cînd se apropie de mal. *Crangon* și *Macropipus* se colectează primăvara la taliencle din regiunea gurilor Dunării, unde migrează masiv dinspre adînc, atrași de ușoara încălzire a apelor continentale vărsate în mare.

Pentru formele carnivore *(Amphipode)* capturarea se face cu capcane, cutii cu pereții din plasă de sîrmă deasă, cu 2—3 orificii mai mari. În aceste cutii se pun bucățele de carne și sînt lăsate pe fund 4—5 ore.

Formele freatice sînt colectaate, din puțuri, cu ajutorul unor filee conice, prevăzute cu o sfoară și o greutate pentru a le menține în poziție

verticală pe fund. În fileu se pune o bucăţică de carne, de preferinţă ficat.

Speciile din freaticul aluvionar se prind săpînd gropi de 20—40 cm. adîncime în imediata vecinătate a ţărmului. Apa subterană ieşită în aceste gropi este trecută prin fileu, fiind colectate apoi animalele.

Disecînd şi analizînd conţinutul stomacal al diferiţilor peşti, se găsesc uneori cantităţi mari de Crustacei, care se pot determina după tegumentul lor devenit transparent prin procesul digestiei.

Crustaceii terestri se adună din locurile umede, pe sub pietre, muşchi, bușteni putreziţi, frunzarul pădurilor, pivniţe, etc.

Prelucrarea probelor cantitative şi calitative bentonice marine, începe prin separarea macrofaunei de microbentonte. Aceasta se realizează prin spălarea succesivă a materialului brut prin site metalice speciale, cu latura ochiurilor de diferite mărimi. Prima sită cu latura ochiurilor de 2 mm reţine scrădişul mare şi microbentosul (moluşte, miside, viermi, crevete, paguri, cumacee, peşti) care se aleg cu ochiul liber. Sitele următoare (1 mm ; 0,50 mm ; 0,25 mm) se folosesc pentru separarea celorlalte animale de diverse talii. Oligochetele, nematodele, ostracodele, harpacticidele, halacaridele, sînt reţinute de site de 0,25 şi 0,10 mm. Ei sînt trecuţi într-un vas cu alcool 70° sau formol 4%.

Materialul reţinut prin sita de 0,25 mm, detritusul vegetal şi animal care adăposteşte crustaceii mărunţi, se răstoarnă într-un vas mai mare. Din acesta se ia cîte puţin şi se pune într-o capsulă Petri, trecînd apoi la triaj. La fel se procedează şi cu materialul rămas pe sita de 0,10 mm. Se aleg apoi materialele străine, diferite resturi, se separă crustaceii. Ultima operaţie se poate face şi cu ochiul liber, cînd animalele depăşesc 2—3 mm.

Proba obţinută prin spălarea algelor în apa de mare se prelucrează într-un mod asemănător. Proba se trece printr-un ciorap obişnuit pentru a se îndepărta apa, iar ceea ce rămîne se introduce într-un cristalizator mic cu formol 4% sau alcool 70°. Materialul astfel concentrat este bogat în corofide, oligochete, nemerţieni, polichete, harpacticide şi ostracode, care se triază şi se pun în tuburi speciale. Uneori datorită numărului mare de corofide, este absolut necesară trecerea materialului prin site cu ochiuri de diferite mărimi. Se izolează astfel miside, cumacee, tanaidacee, polichete mari.

Probele planctonice, freatice şi terestre se fixează direct în alcool 70° sau formol 4%.

Conservarea crustaceilor se face în alcool 70° sau formol 4%. Pentru *ostracode* şi *cladocere* se recomandă folosirea exclusivă a alcoolului 70° pentru a evita decalcifierea.

Amfipodele se conservă în alcool 70° sau 90°.

Racii se fixează şi conservă în formol 10% timp de 15 zile şi apoi se trec în formol 4%. În prealabil animalele sînt anesteziate cu eter sau cloroform. Acelaşi procedeu se poate aplica şi pentru conservarea crabilor.

Formele mici de crustacei, separate pe ordine şi specii, se pot păstra în tuburi de sticlă, cu lichid conservant, cu dop de vată şi etichetate,

așezate apoi în borcane cu dop rodat cu același lichid conservant. Formele mai mari se țin în borcane mari cu dop rodat, cu alcool 70° sau fromol 4%.

Din exemplarele mai mari de crustacei (raci, crabi, paguri, crevete, etc.) se pot executa preparate macroscopice umede. Ele se montează pe o placă de sticlă, legîndu-le de aceasta cu un fir de ață în cîteva locuri. Se introduc apoi în borcane de colecție cu lichidul conservant.

Se pune capacul, băşica de bou, emailacul, eticheta.

Exemplarele mai mici pot fi incluse în rășini sintetice. Din formele mai mici, ca și din diferite piese (antene, valve, apendice toracice și abdominale) obținute în urma disecției animalelor, transparentizate într-un amestec de glicerină, alcool 96° și apă distilată, părți egale, pot fi executate preparate microscopice.

Preparate mai durabile se obțin prin montarea în glicerină gelatină și lichidul Faure (mai ales piese izolate).

Pentru preparate definitive incolore sau colorate, în întregime, cu carmin boracic alcoolic, carmin alunat, acid pirogalic, se folosește incluzia în balsam de Canada.

Pentru o bună colectare a diplopodelor și chilopodelor (altă-dată grupul miriapode) este necesar să se țină seama de epoca lor de dezvoltare. Deoarece majoritatea indivizilor ajung la maturitate toamna, colectarea trebuie făcută începînd din luna octombrie, iar pe timp ploios din septembrie și pînă în primăvară. În regiunile muntoase colectarea se poate face în toate anotimpurile, dar cu rezultate mai bune după topirea zăpezilor.

Cele mai potrivite locuri pentru căutarea Miriapodelor sînt pădurile. În pădurile de fag și mai ales în pătura de frunzar mort din aceste păduri se întîlnesc cele mai multe specii. În pădurile de stejar și conifere se găsesc mai puține forme, fapt explicabil prin lipsa unei pături groase de frunzar și a solului foarte drenabil și foarte acidulat.

Se mai găsesc pe sub trunchiurile de copaci căzuți, bușteni, pietre.

Un material, interesant, se poate captura și în peșteri.

Colectarea Miriapodelor, în majoritatea cazurilor, se face prin prinderea directă cu ajutorul unei pense fine. Formele mici se strîng cu aparate speciale de triat (Tullgren).

Se conservă în alcool 70°. Formol 4% se poate întrebunța uneori ca lichid conservant. Aceasta însă întărește indivizii, apendicele rupîndu-se cu ușurință.

Formele mari capturate se vor introduce totdeauna în tuburi corespunzătoare mărimii lor.

Formele mici, triate se așează în tubușoare de sticlă cu lichidul conservant care se astupă cu dop de vată. Mai multe tubușoare se pun într-un borcan mai mare care se închide ermetic.

Întinderea exemplarelor mai mari pentru colecție este bine să se facă imediat după colectare, deoarece materialul se întărește repede. Se prinde de o placă de sticlă, se introduc în borcane anatomice cu lichidul conservant, se pune capacul, băşica de bou, emailacul, eticheta.

Se pot executa și preparate microscopice mai durabile cu diferite piese (segmente simple sau duble, aparat bucal) obținute în urma unei disecții fine. Acestea se transparentizează într-un amestec de glicerină, alcool 96° și apă distilată părți egale. Se lasă să se evapore alcoolul și apa pînă ajung în glicerină pură.

Se montează în :

— glicerină gelatinată

— lichidul Faure.

Preparate microscopice definitive se obțin prin montarea în balsam de Canada.

Piesele pot fi incolore sau colorate cu carmin boracic alcoolic sau carmin alunat (pentru amănunte vezi preparate microscopice Protozoare și Celenterate).

2. COLECTAREA, PREPARAREA ŞI CONSERVAREA INSECTELOR

2.1. CLASA INSECTA

Clasa *Insecta (Hexapoda)* aparţine încrengăturii *Arthropoda*. Numărul speciilor de insecte cunoscute şi descrise pe întregul glob întrece cifra de un milion, formînd aproximativ 4/5 din regnul animal. Dintre aceste insecte răspîndite în toate mediile de viaţă, unele sînt utile omului, iar o mare parte sînt dăunătoare. Acestea din urmă produc pagube direct omului prin transmiterea diferiţilor agenţi patogeni şi indirect prin vătămările plantelor şi animalelor folositoare acestuia.

Cunoaşterea insectelor se impune din ce în ce mai mult, în vederea aplicării metodelor adecvate de combatere a speciilor dăunătoare şi protejarea celor utile.

Pentru studierea faunei de insecte şi întocmirea unei colecţii entomologice, trebuie ca înainte de toate să se procure *materialul biologic*. Acest lucru este posibil numai dacă se cunoaşte felul lor de viaţă, dacă trăiesc pe sol sau în apă, la cîmpie, deal sau munte, în ce perioadă a anului apar, dacă se întîlnesc ziua sau noaptea, cu ce plantă se hrănesc sau dacă duc o viaţă parazitară etc. Aceeaşi însemnătate o are şi întrebuinţarea *utilajului necesar*, precum şi aplicarea corespunzătoare a numeroaselor *metode* de prindere a insectelor. Tehnica strîngerii şi preparării acestora nu este complicată, dar trebuie respectate anumite procedee pentru a putea fi utilizată de toţi cei care doresc să cunoască mai de aproape acest interesant şi vast grup de animale.

Colectarea şi prepararea insectelor necesită următoarele *utilaje, instrumente* şi *materiale:* fileu entomologic, lupă de buzunar, pensă, borcan entomologic, exhaustor, pensetă cu rachete, tuburi cu dopuri de plută goale sau cu alcool de 70 grade, cutii din carton de diferite dimensiuni pentru transportul şi păstrarea insectelor colectate, cutii pentru insectele vii şi omizi, cutii de insectar, pliculeţe pentru fluturi, săculeţe din pînză sau material plastic, un briceag (cuţitaş), umbrelă entomologică, greblă pentru pupe, furcă cu 3 gheare, vase cilindrice din tablă, ciorpac, dragă, pipete, cristalizoare, ace entomologice, ace cu gămălie, carton, vată, hîrtie sugativă sau filtru, plăcuţe de plută, turbă, polistiren expandat, carton simplu şi ondulat, măduvă de soc, etaloare, dispozitiv pentru uscat omizi, aparat Tullgren, fotocolector, biocenometru, lame, lamele, naftalină, gumă arabică, sindeticon, acetonă, celuloid, alcool,

formol, eter acetic și sulfuric, cloroform, substanțe atractante, soluții pentru preparate microscopice, pentru conservarea larvelor și distrugerea mucegaiului din colecții etc.

Cea mai simplă metodă pentru prins insectele este *culegerea directă*, care se efectuează cu mîna, pensa sau cu o pană muiată în alcool.

Cu mîna se pot colecta insecte al căror zbor este greoi (*Lucanus cervus, Cerambyx cerdo, Oryctes nasicornis* etc.). Unele insecte foarte bune zburătoare, cum sînt odonatele, se pot prinde și cu mîna, dar numai pe vreme ploioasă sau dimineața foarte devreme, cînd stau nemișcate pe plante.

Cu pensa se colectează insecte care-și duc viața pe sol, sub pietre, scoarța arborilor, bușteni căzuți, în inflorescențele plantelor și diferiți biotopi în care trăiesc specii cu zborul mai slab, ca de exemplu unele coleoptere, dermaptere, diferite larve terestre (de pe frunze și ramuri) și acvatice (efemeroptere, plecoptere, trihoptere, blefaroceride).

Cu pana muiată în alcool de 70 grade se pot aduna insecte care au corpul moale, fragil, ca: apterigote, unele homoptere, himenoptere parazite etc.

Cel mai răspîndit mod de colectare se efectuează cu ajutorul *fileului sau plasa de prins insecte* (fig. 60). El constă dintr-un sac lung de

Fig. 60. Fileu entomologic.

45—50 cm, cu vîrful rotunjit, confecționat din pînză mai rară sau mai deasă, albă, galbenă, verde sau albastră deschis, fixat pe un cerc metalic cu diametrul de 25—30 cm și prevăzut cu o coadă de 80—90 cm lungime. La unele filee, cercul metalic poate fi demontabil și pliabil, permițînd schimbarea rapidă a pînzei și transportul mai ușor. Cu un astfel de fileu se prind insecte direct din zbor sau prin cosiri peste diferite plante cultivate sau spontane, prin scuturarea ramurilor înfrunzite ale arborilor și arbuștilor în el. Trebuie strîns tot materialul în fileu, deoarece în acesta se pot găsi unele exemplare extrem de rare, care ar putea fi aruncate din neatenție.

Insectele colectate în fileu se răstoarnă în *borcanul entomologic* (fig. 61). Acesta are de obicei 200—250 cm^3 și este prevăzut cu un dop de plută. Pe partea inferioară a dopului, se fixează cu ajutorul unui ac cu gămălie, o pungulița din tifon cu vată înăuntru, pe care se toarnă cîteva picături de eter acetic sau cloroform cînd se începe colectarea. În interiorul borcanului se introduc mai multe fîșii de hîrtie moale sau

de filtru, cu lățimea de aproximativ 3—4 mm și pliate, care au rolul de a nu lăsa insectele să se atingă între ele și să-și distrugă antenele, picioarele, aripile, precum și de a absorbi eventualele lichide lăsate de acestea. Insectele introduse în borcan mor asfixiate de vaporii de eter sau cloroform, fără să-și umecteze corpul.

O atenție deosebită trebuie acordată fluturilor și insectelor prevăzute cu ac, prinse în fileu. La început se observă în ce loc al fileului se găsesc. Apoi, fluturii se țin prin pinza fileului cu două degete, după care aceasta se întoarce pe dos ca un buzunar și ei sînt introduși în borcan. Insectele care înțeapă (albine, bondari, viespi) se iau din fileu în alt mod. Se apropie de ele, pe dedesubt, prin plasă, borcanul entomologic deschis, iar după ce insectele intră în interiorul acestuia se astupă borcanul. Sub acțiunea anestezicului, după cîteva secunde acestea nu se mai mișcă și pot fi luate fără teamă.

Pe teren sau în laborator, se răstoarnă întreg conținutul borcanului pe o coală de hîrtie albă și se procedează la alegerea insectelor.

Cele cu o pilozitate bogată se așază în cutiuțe de diferite dimensiuni, pe un strat de vată.

Fig. 61. Borcan entomologic.

Fluturii se pun în *pliculețe* speciale triunghiulare, confecționate din hîrtie subțire și transparentă, după modelul din fig. 62. Se ia o bucată de hîrtie cu dimensiunile de 14 cm lungime și 10 cm lățime (fig. 62 I) și se îndoaie după o linie diagonală în așa fel ca să se lase la ambele capete cîte 2 cm (fig. 62 II); prin această îndoire rezultă două clape (I și S, fig. 62 II). Se îndoaie clapa I în jos (fig. 62 III), apoi colțul C, care rămîne în afară (fig. 62 IV). Rezultă astfel un plic triunghiular, în care se așază fluturele cu capul în jos și fețele dorsale ale aripilor

alăturate. Se îndoaie clapa S (fig. 62 V), apoi colțul C (fig. 62 VI). În aceste pliculețe se introduc și fluturii omoriți în alt mod : după ce li se apropie aripile așa încît fețele superioare să fie lipite, se strîng de torace între degetul mare și arătător, printr-o apăsare continuă care se intensifică treptat, pînă cînd nu se mai mișcă. În felul acesta ei mor prin asfixiere fără să se zbată și să-și strice aripile.

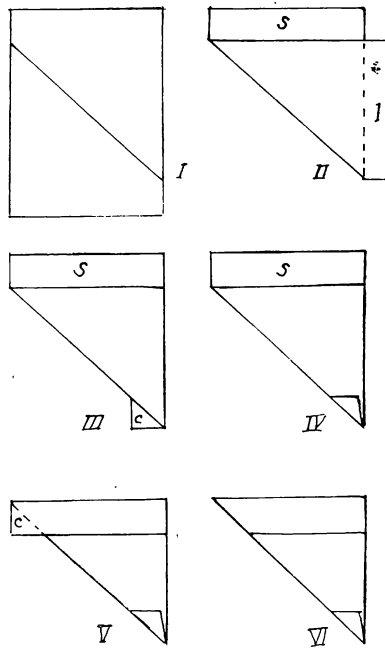


Fig. 62. Pliculețe pentru fluturi.

Celelalte insecte din borcanul entomologic (coleoptere, heteroptere, homoptere, unele dipter etc.) se introduc direct în tuburi cu alcool de 70 grade.

Exemplarele mai mari de odonate nu se omoară după metoda obișnuită, ci odată scoase din fileu, li se aplică pe cap un tampon de vată îmbibată cu eter sau cloroform. Pentru menținerea culorilor se recomandă punerea exemplarelor vii cu aripile strînse între foile unei cărți, unde-și golesc intestinul și mor din lipsă de hrană.

Pentru insectele mici (himenoptere, diptere) se mai folosește un borcan entomologic al cărui dop este străbătut de un tub de sticlă, prin care ele pot fi introduse în interior.

Insectele nocturne (lepidoptere, coleoptere, unele himenoptere, ortoptere, adulți de trihoptere, diptere etc.) se atrag cu ajutorul unor *surse luminoase* ca : *becuri, lanterne, lămpi,* montate pe un perete sau alt suport. Insectele din jurul acestora se pot prinde cu fileul sau direct în borcanul cu eter.

În regiunile alpine se folosesc lămpi de tip „Petromax". Se alege o stîncă mai plană sau se așază mai multe pietre unele peste altele și pe ele un ecran din pînză albă. Este indicat ca orientarea instalației să fie spre sud și în locuri ferite de curenți.

Cea mai mare cantitate de insecte nocturne se obține în nopțile întunecate fără lună sau cînd aceasta răsare tîrziu, cînd cerul este acoperit de nori, iar în atmosferă este zăpușeală și o ușoară umiditate, fiind deajuns să se așeze o sursă luminoasă pe o terasă sau numai lîngă un perete alb ori la o fereastră deschisă, pentru a atrage zborul acestora spre lumină. Cu cît lumina este mai strălucitoare și există mai mulți pereți albi în jur, cu atît mai îmbelșugată este recolta de insecte.

Prinderea insectelor la *lumina ultravioletă* este mai dificilă, necesitînd instalații speciale, dar prezintă unele avantaje față de lumina albă. Este mai economică, atrage specii care nu vin deloc sau vin foarte rar la lumina albă și un număr mai mare de femele, dă rezultate mai bune în condiții de vreme neprielnice.

Colectarea fluturilor noaptea se face și cu ajutorul *substanțelor atractante (momeli),* care conțin o componentă dulce și alta puternic mirositoare. Substanțele dulci utilizate sînt : zahărul, siropurile, mierea de albine, dulceața și altele, iar cele mirositoare : berea, diferite esențe, eterul, romul etc. În compoziția acestor substanțe ademenitoare mai intră și făina de grîu care ușurează prinderea de obiectele pe care se întind.

I. Nemeș, în cartea *„Insectarul meu",* indică unele rețete în legătură cu cele expuse mai sus, după cum urmează :

— Se amestecă 1 l bere, 500 *g* făină de grîu, 500 *g* micre de albine, 50 *g* drojdie și se lasă să dospească pînă a doua zi.

— Un kg miere de albine, 500 *g* făină, 2 l bere și puțină drojdie de bere se amestecă și se lasă să fermenteze, iar a doua zi se adaugă 25 *g* eter.

— Se amestecă 500 *g* miere de albine, 1 l apă, 1 kg făină, drojdie de bere și puțin rom. A doua zi se adaugă înainte de întrebuințare 500 *g* sirop de zmeură.

— Se dizolvă 250 *g* zahăr într-un litru de bere veche amestecată cu 250 *g* făină de grîu, se adaugă cantități mici de rom, esență de anason și foarte puțin camfor. Se amestecă toate acestea și se pot folosi imediat.

Cantitățile menționate pot fi mărite sau micșorate în funcție de amploarea activității de colectare a fluturilor.

Cu substanțele atractante se unge scoarța copacilor pe părțile opuse vîntului sau curentului, la înălțimea de 1,30—1,50 m, cu o jumătate de oră înainte de apusul soarelui. De obicei, în jurul arborilor unși se lipește cîte o bandă de hîrtie albă, lată de 10 cm, pentru a putea fi găsiți mai ușor pe întuneric.

Fluturii sînt atrași și de fructele dulci : mere, pere și struguri copți. Merele coapte pot servi, de asemenea, la prepararea unei substanțe ademenitoare care dă rezultate bune.

Această metodă de colectare se aplică în perioada 15 aprilie — 15 iunie și în lunile septembrie-octombrie, în nopți întunecate calde, ușor umede, cu cerul înourat, cînd vîntul adie slab dinspre sud sau vest, iar avantajele ei sînt multiple. Se poate colecta astfel un număr mare de specii, iar fiecare specie în zeci de exemplare, fapt deosebit de important pentru urmărirea variabilității desenului, coloritului și a perioadelor de zbor la multe lepidoptere. În general, la substanțele ademenitoare, în afară de lepidoptere *(Noctuidae, Geometridae, Pyralidae, Tortricidae, Bombycidae* etc.), vin și multe trihoptere, mirmeleonide, cerambicide, carabide, lucanide, diptere, himenoptere.

Un procedeu modern de capturare a insectelor (lepidoptere, scolitide) este prin atractanți sexuali (feromoni). S-a reușit sinteza unor substanțe analoage acestora, care se folosesc în capcane feromonale. Ele sînt confecționate din material plastic, iar în interior se găsesc capsule îmbibate cu feromoni (1 mg feromon/capsulă). Se folosesc 3—4 capcane/ha, la o distanță de 50—60 m. Stimulii emiși de feromoni atrag de la distanță masculi, care se prind de un suport cleios.

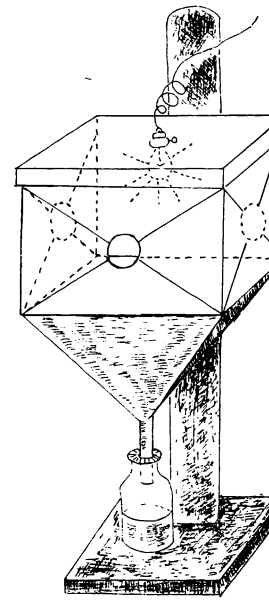
Fotocolectorul (fig. 63) reprezintă un mijloc foarte eficace de colectare a insectelor nocturne. El constă dintr-o cutie confecționată din tablă galvanizată, care are la partea superioară un capac prevăzut ventral cu un bec, iar la cea inferioară o pîlnie metalică pusă în legătură cu un borcan în care se găsește alcool de 70 grade. Trei din pereții cutiei prezintă cîte un orificiu în dreptul becului. Insectele atrase de lumina acestuia, intră prin orificii în interior, apoi prin pîlnie cad în borcanul cu alcool, de unde sînt luate și triate la binocular.

Cu *biocenometrul* (fig. 64) se prind insecte care trăiesc pe sol sau plante joase. El are forma unei găleți răsturnate și este prevăzut în treimea superioară lateral, cu un tub de sticlă sau o eprubetă. Insectele aflate pe suprafața acoperită de biocenometru, în tendința de a se îndrepta spre lumină, se strîng în tubul de sticlă, de unde sînt apoi introduse în borcanul entomologic sau într-unul cu alcool.

Pentru identificarea prezenței unor dăunători care trăiesc pe sau în sol (unele coleoptere, ortoptere etc.) și chiar pentru a-i combate, se pot utiliza *șanțuri* sau *gropi capcană* săpate în cîmp, sub pomi, tufe, pe cărări, sau *ghivece goale, borcane,* în grădini de zarzavat și *vase cilindrice de tablă* îngropate în pămînt pînă la marginea lor și care se controlează zilnic.

Specii de insecte dăunătoare pomilor fructiferi ca și cărăbușul *(Melolontha melolontha),* unele lepidoptere sau alte insecte se pot strînge ușor și cu ajutorul unor *pînze* sau *umbrele deschise,* așezate sub pomi, arbori și arbuști, prin scuturarea acestora dimineața devreme sau pe timp umed.

Fig. 63. Fotocolector



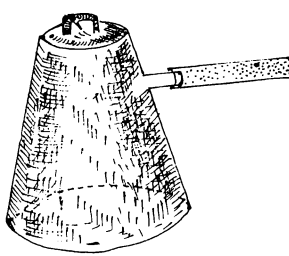


Fig. 64. Biocenometru.

De mult timp entomologii foloseau chiar o *umbrelă* căptușită în interior cu pînză albă (fig. 65 A). Datorită faptului că transportul acesteia pe teren este incomod, s-a înlocuit astăzi cu un *dispozitiv mai simplu* (fig. 65 B). Acesta este format dintr-o pînză albă, fină, dar rezistentă, care se întinde cu ajutorul a 4 sîrme din fier moale sau duraluminiu, groase de aproximativ 2 mm, lungi de 70 cm și reunite la un loc

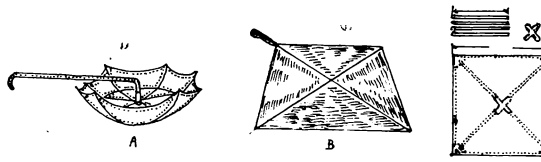


Fig. 65. A—B: Umbrele pentru colectat insecte; C: confecționarea umbrelei entomologice.

printr-o piesă centrală în formă de cruce. Sîrmele se fixează cu un capăt în această piesă, iar cele 4 capete libere se prind de colțurile pînzei, care are forma patrată, cu latura de 1 m. Pe margini pînza este tivită, iar colțurile sînt întărite și prevăzute cu cîte o copcă, în care se prind capetele sîrmelor (fig. 65 C). Această umbrelă se transportă demontată.

Insectele care-și duc viața în sol se colectează săpîndu-se pămîntul și urmărindu-se galeriile acestora pînă la găsirea cuibului.

Cele care trăiesc pe sub diferite pietre se găsesc ușor prin simpla răsturnare a acestora.

Entomofauna ascunsă în mușchi, frunzar, trunchiuri putrede, sol, dejecțiile animalelor etc., poate fi găsită folosind o mică *furcă cu 3 gheare* (fig. 66), cu care se răscolește în astfel de locuri.

Fig. 66. Furcă cu trei gheare.

Frunzarul din pădurile de foioase și conifere se strînge în *pungi* din material plastic sau *săculețe* din pînză deasă. Adus în laborator, se întinde pe o coală albă de hîrtie și se aleg cu pensa insectele mari și mijlocii, iar cu o pană muiată în alcool cele de dimensiuni mici și foarte mici; sau acesta se cerne, adunîndu-se insectele mici cu pana. Pentru obținerea tuturor animalelor din frunzar, se procedează la trierea cu ajutorul *aparatului Tullgren* (fig. 67 A, B).

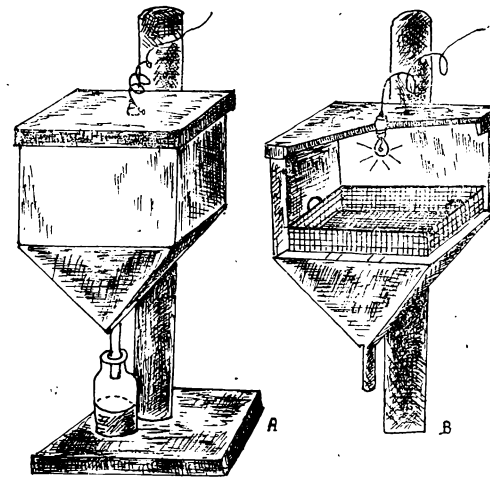


Fig. 67. A : Aparat Tullgren văzut la exterior ; B : văzut la interior

Acesta constă dintr-o cutie paralelipipedică cu latura mare de 55 cm, latura mică de 38 cm și înălțimea de 30 cm. Ea este confecționată din tablă galvanizată și are un capac ce poartă pe fața internă un bec electric. La partea inferioară este atașată o pîlnie metalică, terminată cu un tub deschis care se introduce într-un borcan gol sau cu alcool de 70 grade. În interiorul cutiei, la baza ei, există două bare de sîrmă groasă, pe care se așază un coș din pînză metalică cu ochiurile de diferite dimensiuni. În aceasta se pune frunzarul colectat, apoi se închide capacul și se aprinde becul. Acesta nu trebuie să fie prea puternic, deoarece produce uscarea materialului din interior într-un timp scurt și unele animale pot muri fără a trece în pîlnia aparatului. Însă nu trebuie să fie nici prea slab, deoarece uscarea materialului se face lent, iar animalele trec foarte încet prin sită. Stînd prea mult în aparat, insectele prădătoare pot distruge multe dintre vegetariene sau detritusivore, denaturînd astfel rezultatele. Frunzarul din acest aparat începe să se usuce din cauza căldurii produse de bec, iar insectele, căutînd un refugiu, cad prin sită în pîlnie și de aici în borcanul cu alcool, de unde se iau și se separă la binocular. Pentru a obține insectele vii se lasă borcanul gol sub pîlnie. Aparatul Tullgren prezintă unele avantaje față de alte aparate. Cu ajutorul lui se obțin multe animale, care prin alte metode sînt extrem de greu de găsit. El poate avea o întrebuințare

foarte largă în cercetările de faună fie sistematico-ecologice, fie statistico-biologice la artropode, obținîndu-se date precise cu privire la raporturile numerice dintre diferite grupe de animale într-o anumită cantitate de material sau pe o suprafață dată. Trierea animalelor se face într-un timp cu mult mai scurt. Spațiul lăsat între peretele aparatului și coșul metalic face ca evaporarea apei din materialul existent în interior să se facă cu ușurință și să nu se mai producă condensarea vaporilor pe pereții cutiei, ceea ce ar dăuna bunei funcționări. Scoaterea materialului triat și curățirea cutiei și a pîlniei se fac fără a deplasa aparatul de la locul lui, ci numai coșul din plasă metalică.

În același mod se procedează cu mușchii și lichenii colectați tot în săculețe din pînză.

Pentru capturarea insectelor care stau în repaos pe flori sau sînt amorțite de frigul nopții, ca și pentru cele ascunse în frunzișuri, se folosește *penseta cu rachete* (fig. 68). Aceasta se confecționează din sîrmă semiotelită sau sîrmă de duraluminiu și se îmbracă cu un material foarte fin, întărindu-se pe margini cu o fîșie de pînză mai rezistentă.

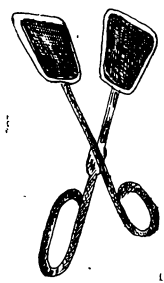


Fig. 68. Pensetă cu rachete.

Un instrument special pentru prinderea insectelor de pe plajele rîurilor, bălților și din locurile în care nu se poate folosi fileul este *exhaustorul* (fig. 69 A, B). Acesta constă dintr-un tub mai larg de sticlă de lungimi diferite, închis la extremități cu cîte un dop de plută. La un capăt dopul este străbătut de un tub de cauciuc (a) a cărui deschidere internă este acoperită cu o sită din tifon, mătase sau metal, prin care se aspiră, iar la celălalt capăt un tub de sticlă (b), care se plimbă pe substrat absorbind insectele ce se string în tubul de sticlă (c). Se aspiră cu gura (fig. 69 A) sau cu o pară de cauciuc fixată la același capăt cu tubul de sticlă (fig. 69 B). După colectare se scoate dopul de la unul din capetele dispozitivului, iar materialul din interior se trece în borcanul entomologic.

Specii de insecte care trăiesc în florile sau inflorescențele diferitelor *plante spontane, se obțin fie pe teren prin scuturarea acestora în* fileu sau pe o foaie albă de hîrtie sau pînză albă, de unde se aleg cu

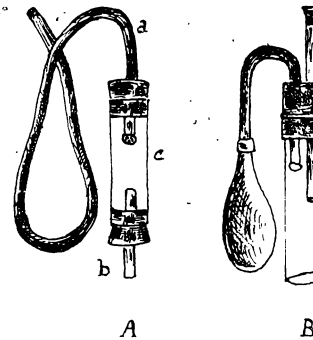


Fig. 69. A : Exhaustor cu tub de cauciuc ; B : cu pară de cauciuc.

ajutorul penei muiată în alcool de 70 grade, fie la laborator prin transportarea inflorescențelor în săculețe din pînză bine legate la capete.

Himenopterele parazite (ihneumonoide, calcidoide, proctotrupoide etc.) se pot obține și direct din gazdele lor, prin colectarea și creșterea acestora în laborator, în borcane de diferite mărimi, acoperite cu tifon sau pînză prin care pătrunde aerul.

Malofagele întîlnite pe corpul păsărilor și mamiferelor se colectează în diferite perioade ale anului, atît de pe gazde vii, cît și de pe cele moarte.

Colectarea țînțarilor *(Culex, Anopheles)* se poate efectua și în camere, cu ajutorul unor eprubete scurte. Acestea se țin perpendicular pe perete, aplicînd orificiile peste insecte. După cîteva clipe, cînd țînțarii se îndreaptă spre fundul eprubetelor, acestea se îndepărtează de perete și se astupă cu degetul. Apoi se trec în cutii special amenajate, pentru a putea fi transportați la laborator.

Sifonapterele (puricii) se pot aduna vii de pe corpul gazdei sau anesteziate. Pentru obținerea în stare vie este necesar să se imobilizeze gazda și să se controleze cu multă grijă. Pentru obținerea prin anestezierc trebuie expus animalul parazitat cîteva secunde în vapori de cloroform sau eter sub un clopot de sticlă. Insectele anesteziate se adună pe un fond alb. Se colectează și după sacrificarea animalului, care se așază pe un fond alb, iar cînd paraziții îl părăsesc pot fi observați și prinși. În cuiburile animalelor parazitate de sifonaptere, se sapă galerii pînă la camerele de locuit, de unde se ia conținutul, care ulterior se triază în laborator.

Dejecțiile și cadavrele animalelor, constituie o sursă bogată de colectare a unor coleoptere.

Pentru prinderea gîndacilor de bucătărie *(Blatta (Periplaneta) orientalis, Phyllodromia germanica)*, din locuințe și depozite, se folosesc diferite borcane cu resturi de alimente, rezemate pe un suport sau

înconjurate cu cîrpe ori hîrtie, pe care insectele se urcă și cad în interior nemaiputînd ieși. În felul acesta ei pot fi strînși și distruși.

Galele produse de himenoptere — *Cynipinae* se colectează numai cînd sînt complet dezvoltate, de pe arborii situați la marginea pădurii, spre luminișuri sau poieni. Se introduc în săculețe din pînză sau plicuri, separate pentru fiecare specie și se închid bine, deoarece pot ieși din ele adulții sau paraziții acestora, în timpul transportului.

Insectele acvatice (adulți și larve de heteroptere, coleoptere, larve de odonate, diptere) se pot strînge cu ajutorul unui *ciorpac* confecționat din pînză de bună calitate, rezistentă, care se trece printre plantele submerse, sau cu *draga* de pe fundul mîlos sau nisipos al apelor. Acest material se răstoarnă într-o tăviță de tablă, în care se pune apă pînă la jumătate, se spală și se strecoară printr-o sită potrivit de deasă, alegîndu-se insectele pe care dorim să le colectăm.

Strîngerea insectelor din apă se face din primăvară pînă toamna tîrziu, dar mai ales primăvara și vara, în zilele cu soare. Bogate recolte de insecte acvatice se pot obține și după retragerea apelor provenite din inundație sau topirea zăpezilor, luînd cantități de nămol, care se spală și se strecoară.

Paralel cu colectarea insectelor adulte, pentru întocmirea unui insectar complet, este necesară înzestrarea lui și cu celelalte stadii de dezvoltare. Pentru aceasta trebuie să se strîngă și ouă, larve, pupe, care se întîlnesc în locuri mai ferite.

Ouăle de insecte se pot obține în două feluri : de la femelele fecundate, colectate în deplasările pe teren și prin căutarea pontelor pe plante sau în alte locuri unde acestea sînt depuse.

Larvele diferitelor insecte trebuie căutate în toate mediile, în special pe plante, dar și în apă, pămînt, dejecții, substanțe intrate în descompunere. Ele pot fi omorîte în borcane cu vapori otrăvitori sau în alcool de 70 grade. Se recomandă ca înainte de aceasta să se lase cîtva timp vii, pentru a-și goli conținutul tubului digestiv.

Omizile vii se adună în *cutii speciale* (fig. 70), în care se și transportă la laborator. Ele se confecționează din lemn, au capacul de sticlă, iar pe unul din pereți, un orificiu acoperit cu sită de mătase, pentru aerisire. În interior se pun frunze, care să servească drept hrană.

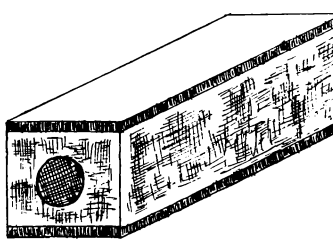


Fig. 70. Cutie pentru omizi și insecte vii.

Pupele (crisalidele) care stau fixate pe plante, garduri, pereți sau în locuri ascunse, se colectează cu o mică porțiune din substrat. Cele care se află în pămînt se scot la suprafață cu ajutorul unei *greble cu dinți lungi și rari* (fig. 71) și se introduc într-o cutie cu vată. Pu-

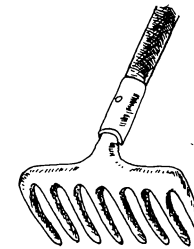


Fig. 71. Greblă pentru căutat pupe în pămînt.

pele insectelor care trăiesc în lemn se obțin după ce cu o perie aspră se freacă scoarța copacilor, deschizînd galeriile în care acestea se găsesc.

În general, insectele colectate *se transportă* la laborator în borcanul entomologic, insectare (înțepate cu ace dacă timpul permite prepararea pe teren), tubușoare goale ori cu alcool, diferite cutii din carton gros sau placaj al căror capac poate fi ținut perfect închis cu ajutorul unui inel de cauciuc. Cutiile din material plastic se pot folosi cu succes în acest scop. În cutii, materialul entomologic se așază între straturi de vată, care trebuie să fie puțin presată, spre a feri insectele să se lovească între ele în timpul transportului. Între fiecare strat de vată și insecte se plasează cîte o foaie de hîrtie obișnuită sau creponată, pentru ca vata să nu se prindă de apendicele insectelor. Plicurile cu fluturi se așază într-o cutie specială, între straturi de vată. Pentru transportul insectelor vii sînt necesare pe lîngă cutiile speciale și cîteva cutiuțe din carton, cutii de chibrituri etc., sau tuburi goale și sticluțe de medicamente astupate cu dopuri de plută sau plastic, perforate pentru aerisire. Trebuie ținut seama să nu se găsească la un loc specii de insecte răpitoare, cu altele care ar putea fi consumate de acestea. Pupele se transportă în cutii căptușite cu vată, iar manipularea lor trebuie făcută cu atenție fără a fi atinse cu mîna. Scoarța arborilor cu galerii produse de ipide și lemnul atacat de larvele unor insecte dăunătoare aparținînd coleopterelor — *Cerambycidae* sau lepidopterelor — *Cossidae* etc. se pot transporta în săculețe din pînză sau diferite cutii.

Materialul entomologic astfel colectat și transportat la laborator, *se etichetează* notîndu-se cu creionul negru (nu cu cerneală, tuș sau pastă) pentru a se păstra scrisul în alcool, locul și data colectării, biotopul, eventual altitudinea, temperatura, umiditatea etc. ca și numele celui care l-a strîns. Se trece apoi la prepararea și conservarea lui pentru colecție.

Prepararea materialului colectat reprezintă o etapă deosebit de importantă, dar și mai dificilă în munca entomologului. De felul cum sînt preparate insectele adunate în timpul excursiilor, depinde atît păstrarea colecției cît și valoarea ei științifică.

Prepararea insectelor trebuie făcută cît mai repede cu putință. În cazul cînd aceasta nu este posibilă și ele s-au uscat, se trece la înmuierea lor. Se pregătește un vas, în care se introduce un strat de nisip de 3—4 cm, se umezește cu apă, adăugîndu-se o picătură de acid fenic pentru a evita mucegăirea. Pe nisipul umed se așază o hîrtie de filtru și pe aceasta exemplarele uscate. Totul se acoperă cu un clopot de sticlă. În acest mod insectele se înmoaie destul de repede.

Insectele foarte mici, sau cu corpul moale și apendicele subțiri (proture, diplure, tisanure, colembole, efemeroptere, plecoptere), unele homoptere (afidide, psilide), termitele, unele himenoptere (braconide, calcidoide, proctotrupoide, cinipoide), unele diptere etc. se păstrează în *tuburi cu alcool de 70 grade,* astupate cu dopuri de plută sau din vată în cazul că acestea sînt introduse în borcane mari cu alcool și închise ermetic. Stadiile de dezvoltare ale insectelor, montate pe o plăcuță de sticlă mată se pot conserva bine, de asemenea, în borcane cu alcool de 70 grade (fig. 72). Pentru a se obține alcool de 70 grade

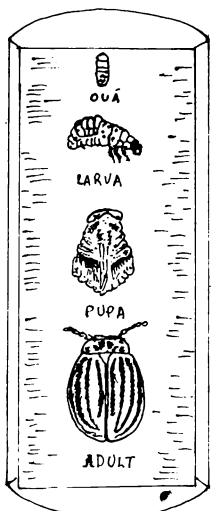


Fig. 72. Borcan cu o insectă (Leptinotarsa decemlineata) în diferite stadii de dezvoltare.

din cel de 92 sau 96 grade care se găseşte în comerţ, se adaugă la 100 cm^3 de alcool, 32 cm^3 apă distilată sau apă curată. Coleopterele se mai pot conserva şi într-un amestec de 90 părţi alcool de 70 grade şi 10 părţi formol 4%.

Insectele mici (coleoptere, diptere, himenoptere etc.) se pot lipi cu sindeticon sau gumă arabică pe *cartonaşe dreptunghiulare* (fig. 73) sau *triunghiulare* (fig. 74), care se înfig apoi cu ace în insectar.

Fig. 73. Insectă lipită pe cartonaş dreptunghiular.

Fig. 74. Insectă lipită pe cartonaş triunghiular.

Exemplarele de talie mare şi mijlocie se păstrează uscate în insectar, înţepîndu-se cu *ace entomologice* în aşa fel, încît caracterele lor distinctive să fie scoase cît mai bine în evidenţă. Aceste ace sînt de grosimi diferite şi fiecare dimensiune este indicată printr-un număr. Cele mai subţiri au numărul 000 (sau 0/3), iar cele mai groase — numărul 7. *Locul de fixare al acului* variază după conformaţia insectelor respective. Astfel, la *coleoptere* (fig. 75) acul se înfige în treimea anterioară a elitrei drepte, iar vîrful iese ventral între perechea a doua şi a treia de picioare; la *heteroptere* (fig. 76) în mijlocul scutelului sau în treimea anterioară a hemielitrei drepte; la *ortoptere* (fig. 77) în pronot; la *lepidoptere* (fig. 78), *himenoptere* (fig. 79), *homoptere* (fig. 80), *odonate* (fig. 81), *diptere* (fig. 82) în mezotorace. Pentru păstrarea structurii toracelui necesară în determinarea dipterelor şi a himenopterelor îndeosebi, este bine ca acul să fie introdus puţin lateral în acesta. Toate insectele trebuie aşezate pe ace la acecaşi înălţime.

În loc de ace entomologice, lepidopterele miniere, dipterele, himenopterele şi alte insecte de dimensiuni foarte mici pot fi înţepate cu *minuţii*

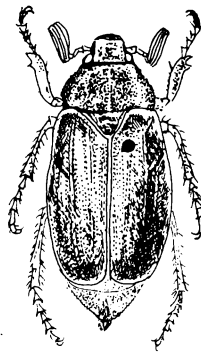


Fig. 75. Coleopter (Melolontha melolontha)

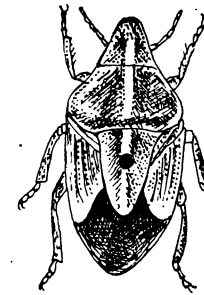


Fig. 76. Heteropter (Aelia rostrata)

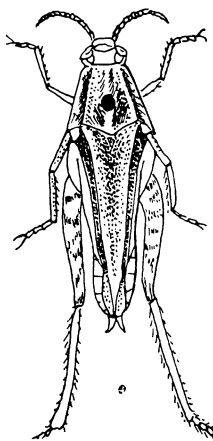


Fig. 77. Ortopter (Calliptamus italicus)

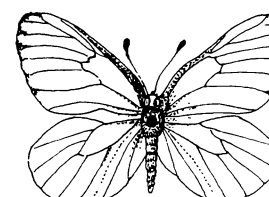


Fig. 78. Lepidopter (Aporia crataegi).

Fig. 79. Himenopter (Aphidencyrtus aphidivorus).

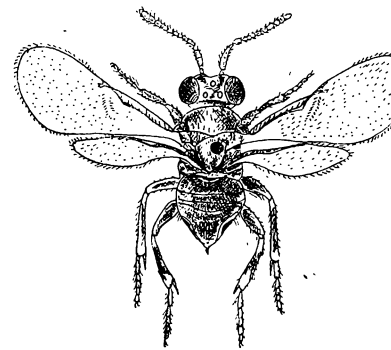


Fig. 80. Homopter (Cicada orni)

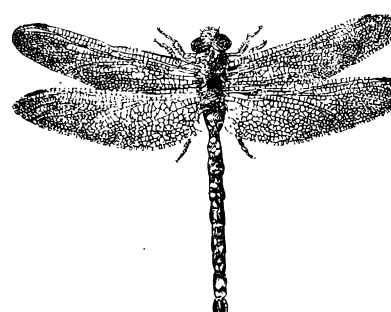


Fig. 81. **Odonat (Aeschna** cyanea).

(ace speciale, foarte fine, fără gămălie), care se înfig în *plăcuțe dreptunghiulare de măduvă de soc* (fig. 83). Acestea se prind apoi în mod obișnuit pe ace entomologice.

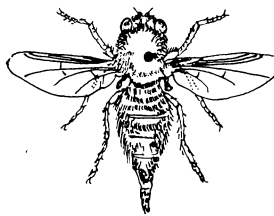


Fig. 82. Dipter (Gastrophilus intestinalis).

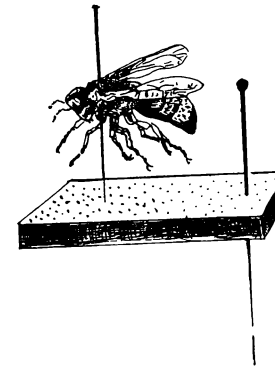


Fig. 83. Insectă preparată pe minuție.

La fiecare insectă, antenele, picioarele și aripile trebuie aranjate cu multă grijă. Această operație se face pe bucăți de plută sau turbă, unde se fixează cu ace cu gămălie în poziție normală. Se lasă cîteva zile și numai după aceea insecta se trece în insectar.

Speciile mari de ortoptere, coleoptere, lepidoptere, cu abdomenul voluminos, care se usucă greu în insectar și adesea se pot descompune pătîndu-l, se prepară în mod special. Se face o incizie laterală, după care se scoate conținutul abdominal și se înlocuiește cu vată îmbibată cu un dezinfectant. Se apropie marginile tăieturii, se lipesc și se lasă astfel să se usuce.

La odonatele care au abdomenul alungit, se introduce de obicei un ac în lungul acestuia, pentru a rămîne întins.

Lepidopterele se prepară cu ajutorul *etaloarului* sau *presa de întins fluturi* sau *măsuța de fixare* (fig. 84). Este un dispozitiv confecționat din lemn de esență moale, format din 2 fețe orizontale sau ușor înclinate și distanțate între ele, pe care se întind aripile pînă la uscare. În mijloc există un jgheab care se poate regla cu ajutorul unui șurub și în care se pune turbă, plută sau material poros. În acest jgheab se așază corpul fluturelui după ce în prealabil a fost fixat pe acul entomologic. Se întind lateral aripile în așa fel, încît marginea posterioară a celor anterioare să fie perpendiculară pe direcția corpului. Aripile astfel aranjate se fixează trecîndu-se peste ele 1—2 fîșii de hîrtie

prinse la capete cu bolduri (fig. 85). Antenele se așază paralel cu marginea anterioară a primei perechi de aripi, punîndu-se sub ele puțină vată ca să stea în poziția normală. Se lasă astfel să se usuce 12—14 zile, în locuri ferite de praf, umezeală, dăunători etc., după care se scot și se așază în cutia de insectar. În mod asemănător se

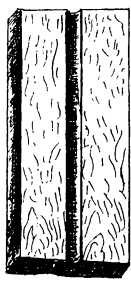


Fig. 84. Etaloar.

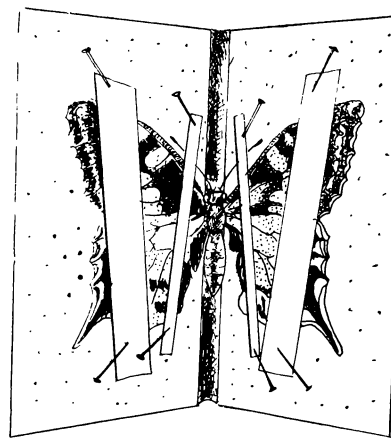


Fig. 85. Lepidopter întins pe etaloar.

prepară și efemeropterele (fig. 86), odonatele, himenopterele, dipterele, ortopterele și alte insecte, care au aripi de dimensiuni mari. La ortoptere, aripile se întind de ambele părți ale corpului sau numai pe o singură parte.

Unii fluturi cu solzi foarte delicați trebuie fixați pe ace și așezați în cutii chiar pe teren, pentru a-i putea conserva în perfectă stare.

Ouăle de insecte se pot prepara în condiții foarte bune dacă sînt tratate la început cu apă fierbinte. După aceea se înțeapă cu un ac foarte fin, se introduc cîte 2—3 ore în formol și alcool de 96 grade. Alcoolul se schimbă o dată. La sfîrșit se trec în xilol și după ce se usucă, se lipesc pe bucățele de carton sau celuloid. Ouăle se fixează în colecție alături de celelalte stadii ale speciei respective.

Omizile se prepară prin uscare și pe cale lichidă.

Prepararea prin uscare. Se recomandă ca înainte de aceasta, omizile păroase să nu mai fie hrănite 2—3 zile, pentru ca intestinul lor să se golească normal de conținut. Cele verzi lipsite de peri ca și cele

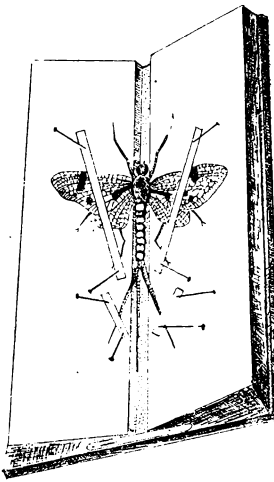


Fig. 86. Efemeropter întins pe etaloar.

viu colorate nu trebuie ținute flămînde pentru a nu-și schimba repede culoarea la uscare. Sînt apoi omorîte cu eter acetic sau cloroform sub un clopot de sticlă. După aceea, se așază pe o hîrtie de filtru și se face o mică tăietură la partea posterioară a corpului. Se presează ușor cu o baghetă cilindrică începînd din partea anterioară spre cea posterioară, pînă cînd se elimină tot conținutul intern. Tegumentul rămas gol se spală într-o baie de formol de 2—4% și se așază pe o hîrtie de filtru, timp de 15—20 minute. În deschiderea posterioară, se introduce aer printr-un tub de sticlă, suflîndu-se cu gura sau cu o pară de cauciuc ca să se întindă corpul, ținîndu-l în interiorul unui *dispozitiv de uscare* (fig. 87), deasupra unei surse de căldură. Această operație durează pînă cînd tegumentul omizii se întărește păstrînd forma naturală: Se scoate tubul de sticlă și se introduce în locul lui un pai subțire care se taie scurt, apoi se înfige în el acul entomologic cu care se fixează în insectar (fig. 88). Tăietura posterioară se lipește cu clei de celuloid. Conținutul intern al larvei se mai poate înlocui cu o soluție vîscoasă de celuloid dizolvat în acetonă. Acetona se evaporă, iar celuloidul se întărește și în felul acesta se păstrează aspectul natural al corpului omizii.

Pentru prepararea omizilor păroase este necesar să se efectueze mai multe orificii pe partea dorsală și laterală a corpului cu ajutorul

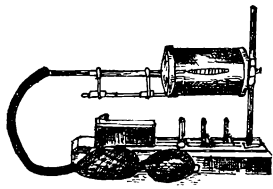


Fig. 87. Dispozitiv pentru uscat omizi.

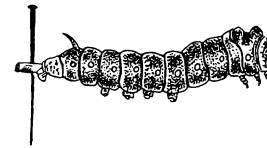


Fig. 88. Omidă preparată pentru colecție.

unui ac, după care se fierb timp de 10—15 minute într-un vas cu formol și se țin acoperite 24 ore. Se așază apoi pe o plăcuță de plută, se fixează cu bolduri și se țin 5—10 ore într-un vas cu alcool de 96 grade, care se schimbă de 2 ori. Se trec cîte două ore în xilol și eter sulfuric, apoi se lasă la uscat și în cele din urmă se lipesc pe carton.

Larvele se păstrează de cele mai multe ori în *lichide conservante,* alcool sau formol. Se recomandă ca acestea să se țină o zi în alcool de 65 grade, apoi 2—3 zile în alcool de 70 grade, după care se trec definitiv în alcool de aceeași concentrație. Omizile mari, cu corpul tare pot fi introduse direct în alcool de 85—90 grade. Formolul, în concentrație de 3—4%, decolorează mai puțin larvele, însă le întărește și le degradează. Pentru evitarea înegririi exemplarelor deschise la culoare, acestea se pun mai întîi în apă clocotită timp de 10—20 secunde, apoi în alcool sau formol.

Larvele se fixează pe plăcuțe dreptunghiulare de sticlă groasă de 2 mm, cu ajutorul a două fire de mătase sau naylon. Se introduc apoi în borcane de diferite dimensiuni pline cu lichid conservant și astupate ermetic.

Larvele se mai pot conserva în următoarea soluție :

Alcool	375 g
Apă distilată	500 g
Sublimat corosiv	8 g
Alaun calcinat	90 g

Se amestecă toate și se lasă 24 ore. Se introduc larvele în această soluție, iar după un interval de 2 luni se schimbă lichidul, care rămîne definitiv.

Colecțiile de omizi, preparate atît prin uscare cît și pe cale umedă (în eprubete așezate în stative, borcane etc.) se păstrează în dulapuri cu geam.

Pupele se omoară prin căldură, apoi se usucă și se acoperă cu un strat de lac incolor. Ele mai pot fi omorîte lăsîndu-se timp de o zi în alcool cu puțină apă. În felul acesta se usucă mai repede și, în

plus, sînt mai ferite de atacul dăunătorilor. Pupele omorîte pot fi injectate cu o soluție de arsenic pentru conservare.

Crisalidele se conservă în formol, sau după ce au fost omorîte la temperaturi înalte, se lipesc pe plăcuțe mici din carton alb sau celuloid, care, cu un ac entomologic, se fixează în colecție alături de fluturi, larve și ouă.

Insecte de dimensiuni foarte mici sau părți ale corpului (antene, aparate bucale, aripi, picioare, armătura genitală etc.) se pot monta în *preparate microscopice* între lamă și lamelă (fig. 89), folosind soluțiile: IMMS, Faure, Ionescu, Berlese, Balsam de Canada, gelatină glicerinată. Dintre acestea, soluțiile Ionescu și Faure sînt cele mai utilizate de entomologi.

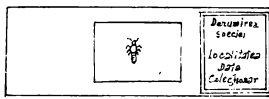


Fig. 89. Preparat microscopic.

Soluția Ionescu are următoarea compoziție:

Chloralhydrat	40 g
Gumă arabică	10 g
Sirop de glucoză	5 g
Acid acetic glacial	5 g
Glicerină	5 g
Apă distilată	20 cm³

Se pregătește la început soluția de gumă arabică, punîndu-se praful de gumă într-un vas cu apă distilată și lăsîndu-se să se dizolve la temperatura camerei. După depunerea impurităților timp de 1—2 zile, soluția se decantează și se filtrează de două ori prin vată de sticlă (Glaswolle).

Se prepară apoi siropul de glucoză din praf de glucoză și apă distilată, dizolvînd glucoza în apă caldă și fierbînd-o pînă se îngroașă.

După aceste două operații, se procedează la prepararea soluției de montat. Pentru aceasta, se pun într-un borcan cristalele de chloralhydrat, peste care se adaugă soluțiile de gumă arabică și glucoză, acidul acetic glacial și glicerina. Se încălzește totul 15—20 minute pînă cînd amestecul devine lichid. Se lasă apoi să se depună eventualele impurități, iar după o zi se decantează și soluția se păstrează într-un borcan brun.

Soluția Faure are următoarea compoziție:

Chloralhydrat	100 g
Gumă arabică	50 g
Glicerină	40 g
Apă distilată	100 cm³

Se dizolvă guma arabica în apă distilată de 80°C și se filtrează. Se adaugă chloralhydratul și glicerina și se încălzesc ușor pînă ce

acetocul devine omogen. Se păstrează în borcane de sticlă brună cu dop rodat.

În picătura de soluție Faure de pe lamă se așază insecta sau diferite piese și apendice, după ce în prealabil au fost clarificate în KOH sau lactofenol, spălate în alcool și trecute într-un amestec de alcool, glicerină, apă, în părți egale. Deasupra se aplică lamela care se presează ușor pînă cînd soluția se întinde uniform între lamă și lamelă. Pe lamă se lipește eticheta respectivă. Preparatele microscopice se lasă apoi să se usuce la termostat, după care se păstrează în cutii speciale.

Avantajele soluției Ionescu sînt următoarele : nu cristalizează, se usucă mai repede decît celelalte soluții, nu face bule de aer, se dizolvă ușor în apă, ceea ce permite ca preparatele stricate sau vasele cu care se lucrează să poată fi ușor spălate cu apă, clarifică foarte bine preparatul, putîndu-se observa detaliile cele mai fine ale pieselor. Se pot monta în această soluție mici artropode sau piese ale acestora, care au fost ținute în alcool, formol, apă, acid acetic, glicerină sau orice alt lichid conservant. Este bine ca înainte de a le fixa în preparate, să se țină puțin timp în acid acetic glacial sau chiar în această soluție diluată cu acest acid.

Fructele atacate de insecte se conservă în formol 4%, care se prepară din cel de 40%, adăugîndu-se la 100 cm^3 formol, cantitatea de 1 l apă obișnuită, în prealabil fiind ținute în soluție de $CuSO_4$.

Scoarța și lemnul arborilor atacați se așază în cutii de diferite mărimi.

Galele se păstrează în cutii din carton sau lemn, în alcool sau herbarii.

Cu părți ale *plantelor atacate* de insecte se întocmesc herbarii

Materialul entomologic astfel preparat este apoi prelucrat în laborator și așezat în insectar, însoțit de o *etichetă* scrisă în tuș.

Cutia-insectar (fig. 90) se confecționează din carton sau orice fel

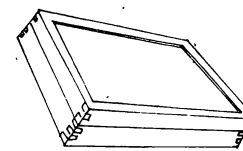


Fig. 90. Cutie-insectar.

de lemn. Lemnul de conifere are un avantaj asupra celorlalte esențe, datorită mirosului de rășină care persistă cîțiva ani și care îndepărtează insectele dăunătoare. În interiorul insectarului se lipește un strat de polistiren expandat de 10—12 mm grosime, plută, turbă sau 2—3 rînduri de carton ondulat, care apoi se acoperă cu hîrtie albă. Acest strat poate fi înlocuit cu discuri tăiate din dopuri de plută, care se lipesc pe fundul cutiei. Capacul trebuie să fie prevăzut cu geam. Se pot face cutii și fără capac de sticlă, dar în acest caz, pentru cercetarea conținutului trebuie ridicat capacul, fapt care, repetat de mai

multe ori, provoacă distrugerea insectelor. Dimensiunile cutiilor-insectar variază, dar ele trebuie să îndeplinească următoarele condiții: să fie rezistente, să nu permită pătrunderea prafului și a diferiților dăunători, să poată fi mînuite cu ușurință și să permită observarea pieselor pe care le conțin.

Insectarul nu se întocmește la întîmplare. Astfel, insectele se pot aranja în *ordine sistematică*, indicîndu-se pe etichete speciale ordinul, familia, genul, specia, locul din care provin, data colectării și numele specialistului care le-a determinat. Dacă lipsește spațiul necesar pentru aplicarea etichetelor se pot întrebuința mici pătrățele, triunghiuri sau dreptunghiuri din hîrtie care se numerotează și se fixează în dreptul insectelor, iar într-un colț al cutiei se așază o etichetă mai mare cu explicația numerelor.

Pentru a nu se produce unele greșeli în alcătuirea insectarului sistematic, considerăm necesar să prezentăm actualul sistem de clasificație al insectelor bazat pe două subclase, cu un număr de 32 ordine.

Clasa *Insecta*

I. Subclasa *Apterygota*

Ordinele: *Collembola, Protura, Diplura, Thysanura.*

II. Subclasa *Pterygota*

Ordinele: *Ephemeroptera, Plecoptera, Odonata, Embiodea, Orthoptera, Phasmida, Blattaria, Dermaptera, Mantodea, Isoptera, Zoraptera, Corrodentia, Mallophaga, Anoplura, Thysanoptera, Heteroptera, Homoptera, Hymenoptera, Coleoptera, Strepsiptera, Megaloptera, Rhaphidioptera, Planipennia, Mecoptera, Trichoptera, Lepidoptera, Diptera, Siphonaptera.*

În mod obișnuit, studierea insectelor se face pe exemplare întregi. Dar, pentru o cercetare minuțioasă a structurii acestora este necesar să se întocmească și colecții cu cîte o *insectă dezmembrată* (fig. 91), iar pentru comparație, cu mai multe astfel de insecte sau numai cu anumite părți ale corpului acestora (aripi, picioare, antene).

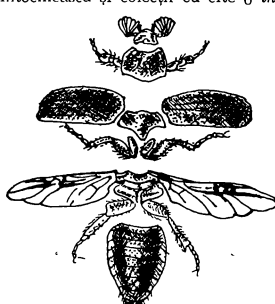


Fig. 91. Insectă (Melolontha melolontha) cu corpul dezmembrat.

Insectele dăunătoare și cele *folositoare* formează cîte o temă în alcătuirea unui insectar.

În cazul celor dăunătoare se pot prezenta stadiile de dezvoltare și părți ale plantelor atacate de ele. La insectele folositoare prin produsele lor *(Apis mellifica, Bombyx mori)* pot fi arătate, de asemenea, aceste stadii și probe de miere, faguri și respectiv mătase, rase. Insectele entomofage (prădătoare și parazite) și polenizatoare se așază în ordine sistematică.

Unele insecte ca *Lymantria dispar, Pieris brassicae, Melolontha melolontha, Lucanus cervus, Oryctes nasicornis,* oferă exemple frumoase de *dimorfism sexual,* cu care se întocmesc interesante colecții entomologice.

Problema *păstrării* în bune condiții a unei colecții prezintă aceeași importanță ca și munca de colectare și preparare. De aceea, trebuie să se cunoască neapărat atît dușmanii colecțiilor cît și măsurile necesare pentru a-i distruge.

Pentru *prevenirea atacurilor dăunătorilor, Anthrenus museorum, Dermestes lardarius, Attagenus pellio, Troctes divinatorius,* molii, procedeul care a dat pînă în prezent cele mai bune rezultate, este de a se asigura pentru fiecare cutie un miros penetrant, neagreat de către dăunători. În mod curent se folosește *naftalina,* care se așază sub formă de cristale în pungulițe din tifon, la unul din colțurile cutiilor. Prin volatilizare naftalina se pierde și din acest motiv ea trebuie înlocuită din 6 în 6 luni.

În afară de dăunătorii animali, colecțiile de insecte sînt atacate și de *mucegai.* Pentru distrugerea acestuia se poate întrebuința următoarea soluție :

Creozot	12 părți
Benzină rectificată	6 părți
Acid fenic	6 părți

Pentru prevenirea mucegăirii insectelor ele trebuie păstrate în camere uscate, iar în dulapurile colecției să se introducă un cristalizor cu clorură de calciu, care fiind foarte higroscopică, reține toată umezeala din interior.

Cocleala apărută uneori pe acele entomologice, se îndepărtează cu ajutorul unei pensule înmuiată în amoniac. Ca măsură profilactică, se recomandă întrebuințarea acelor entomologice lăcuite.

Degradări serioase în colecțiile de insecte, pot fi produse de lumina zilei, mai ales cînd acestea sînt expuse direct la soare. De aceea, se recomandă ca insectarele să fie păstrate în dulapuri închise.

Acestea sînt pe scurt, cîteva din metodele de colectare, preparare și conservare a insectelor, care stau la baza întocmirii și păstrării unei colecții entomologice.

3. CREȘTEREA VIERMILOR DE MĂTASE (Bombyx mori)

În țara noastră sericicultura se practică în complexe (ferme) sericicole, C.A.P.-uri — ca sectoare ale fermelor zootehnice, în școli și de către persoane particulare.

Complexul sericicol este dotat cu hale pentru incubația ouălor și creșterea larvelor mici, hale pentru creșterea larvelor mari și un pavilion utilitar.

În cadrul C.A.P.-urilor, școlilor și gospodăriilor populației, care nu posedă construcții sericicole speciale, creșterea se face în orice spațiu, unde există condiții de dezvoltare a larvelor : temperatură constantă, umiditate corespunzătoare, lumină indirectă (difuză), ventilație abundentă, protecție împotriva bolilor și dăunătorilor, hrană de calitate și suficientă, schimbarea așternutului, lipsă de igrasie, curățenie minuțioasă și dezinfectarea suporturilor.

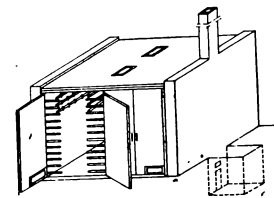
Cele mai uzuale *obiecte de inventar sericicole* sînt : cutii pentru incubația ouălor, termometre, higrometre, suporturi pentru larve și îngoșare, hîrtie perforată (plasă), radiatoare electrice, foarfece pomicole, fierăstrău, coșuri, găleți, cîntar farmaceutic, ceasafuri din pînză, diferite sisteme de mașini și dispozitive mecanizate, instalații de climatizare, formol, var, sodă caustică, precum și un carnet sau registru de evidență.

Pentru incubația ouălor se confecționează tăvi din hîrtie de ambalaj (20 × 12 × 2 cm), corespunzătoare pentru 10 g ouă sau tăvi duble (o ramă externă de 36 × 20 × 1 cm, pe care se lipește o pînză neagră constituind suportul pentru ouă și o ramă internă pe care se lipește pînză albă perforată, așezată peste ouă, prin care vor ieși larvele).

Principalele *etape* ale *tehnologiei creșterii viermilor de mătase* sînt reprezentate printr-o serie de lucrări privind : incubația ouălor, creșterea larvelor, îngoșarea, reproducția, prevenirea și combaterea bolilor și dăunătorilor, înființarea și exploatarea plantațiilor de dud etc.

· *INCUBAȚIA OUĂLOR* se desfășoară în spații climatizate-incubatoare (fig. 92), în unități specializate și durează 12—14 zile. Data începerii incubației trebuie să coincidă cu înverzirea mugurilor de dud adică la jumătatea lunii aprilie în zonele de șes și începutul lui mai în cele de deal (în funcție de prognoză, experiența anilor anteriori, realizarea sumei temperaturilor pozitive necesare dezvoltării mugurilor,

Fig. 92. Climatizor sericicol



180—200°C), iar ecloziunea cu stadiul de 3—5 frunze. Pentru incubația unui kg de ouă este necesară o cameră cu o suprafață de 4 m² și înălțimea de 2,5 m. Aceasta este dotată cu stelaje, pe care se fixează patru rînduri de polițe suprapuse, late de 1 m, la o distanță de 0,4 m față de podea și tavan, lăsîndu-se un spațiu liber de 0,75 m. Se recomandă să mai existe o încăpere necesară păstrării larvelor proaspăt eclozionate, care urmează să fie date pentru creștere. În cazul unor cantități mai mari de ouă (10—15 kg) trebuie mai multe camere, cu volum corespunzător.

Temperatura optimă se realizează în funcție de metoda folosită. În cazul ouălor diapauzate, care se incubează în vederea creșterii generației de primăvară, se aplică metoda ridicării treptate a temperaturii, astfel: 15°C în primele 3 zile, 16—20° C în 2 zile care urmează, 23—24°C în următoarele 4 zile și 25—26°C în ultimele 4—5 zile.

Pentru incubarea ouălor nediapauzate, tratate cu acid clorhidric, în vederea reluării dezvoltării embrionare pentru creșterile repetate de vară-toamnă, se folosește metoda temperaturii constante pe toată durata incubației, adică 25—26°C.

Umiditatea relativă a aerului necesară pentru toată perioada incubației este de 75—85%.

Intensitatea luminoasă recomandată este de 5 lucși pe m² (0,25 Wați), iar *durata* 18 ore neîntrerupt. La albirea ouălor se asigură 36 ore întuneric, după care din nou lumină.

Ventilația se asigură permanent, dar mai intens în perioada ecloziunii.

Ouăle sînt transportate de la centrele producătoare de material biologic la cele de incubație în cutii speciale numite *telaini*, cu o capacitate de 10 g. Fiecare telain se deșartă deasupra unei tăvi care se acoperă cu o ramă cu pînză albă și țesătură largă, o coală de hîrtie perforată și o foiță de pelur.

Ecloziunea larvelor are loc în a 13-a sau a 14-a zi de incubație, dimineața, în jur de ora 9 și durează 2—3 zile, primele puține la număr (spionii) fiind separate sau suprimate. Larvele proaspăt eclozionate pot fi păstrate fără hrană timp de 3 zile, în condiții de 7,5—10°C și 80—85% umiditate, dar se recomandă ca la apariție să existe pe

deasupra hîrtiei perforate din tăvile de ecloziune frunzulițe de dud proaspete, peste care se urcă, putînd fi ridicate ușor și așezate pe suporturi special pregătite. Frunzele se cîntăresc la început, în vederea cunoașterii cantității folosite pentru ridicarea larvelor și după aceea împreună cu larvele, spre a se putea stabili prin diferență greutatea acestora din urmă. În general, larvele recent eclozionate cîntăresc cu 30% mai puțin din greutatea ouălor și în felul acesta se apreciază randamentul incubației și cantitatea de larve care se predă pentru creștere pe teren.

Randamentul se exprimă mai precis prin *procentul de ecloziune*. Acesta se stabilește pe mostre, rezultate dintr-un gram de ouă puse la incubat, din care se separă după ecloziune, ouăle cu coaja albă (din care au ieșit larvele) de cele cenușii (cu embrion mort). Cifra obținută se raportează la numărul total de ouă cît cuprinde gramul de ouă.

Transportul larvelor la locul de creștere nu trebuie să depășească două ore. La distanțe mici se face în cutii de hîrtie (pentru 100—200 g larve), iar pentru distanțe și cantități mari se folosesc paturi de creștere.

CREȘTEREA LARVELOR reclamă cunoașterea cerințelor acestora față de factorii ecologici care le influențează evoluția și a căror dirijare cuprinde limite foarte precise. Procesul tehnologic de creștere a larvelor are ca premisă deosebirile existente între cerințele biologice pe care le manifestă larvele din primele trei vîrste, comparativ cu cele din ultimele două.

Temperatura influențează foarte puternic dezvoltarea larvelor, în sensul că cea ridicată (în limite fiziologice) o accelerează, iar cea scăzută o încetinește. Larvele suportă temperatura cuprinsă între 7°C și 40°C, optimum fiind de 26—28°C pentru vîrstele I și II, 25—26°C pentru vîrsta a III-a, 24—25°C pentru a IV-a și 23—24°C pentru a V-a. În timpul somnului se recomandă creșterea temperaturii cu un grad față de nivelul optim.

Umiditatea acționează asupra dezvoltării larvare, stimulînd sau inhibînd transpirația și favorizînd menținerea calității hranei. Optimum de umiditate pentru larvele din primele trei vîrste este de 85—90%, pentru vîrsta a IV-a de 70—75%, iar pentru a V-a de 65—70%.

Odată cu instalarea somnului, umiditatea se reduce pînă la 75% în primele trei vîrste și 60—65% în ultimele două. În vîrstele mici larvele suportă mai ușor umiditatea ridicată, dar numai corelat cu temperatura ridicată, hrană abundentă, menținerea igienei și ventilație bună.

Lumina are influență favorabilă asupra larvelor, în sensul că le face mai active decît întunericul și construiesc gogoși cu aproximativ 15% mai ușoare. Lumina difuză este preferată în toate vîrstele, adăpostindu-se de cea foarte intensă. În primele trei vîrste larvele manifestă fototropism pozitiv, iar în ultimele două negativ. Intensitatea luminoasă normală pentru întreg stadiul larvar este de 5 lucși/m² ziua și noaptea.

Aerisirea localului este o condiție a reușitei creșterii viermilor de mătase. Aceasta se face din trei în trei ore timp de 15' în primele trei

vîrste și permanent în ultimele două. Concentrația limită tolerabilă de CO_2 este de 0,05% (față de 0,03% a aerului atmosferic). Circulația aerului trebuie să fie de 0,1m pe secundă în încăperile cu larve tinere și de 2 m pentru cele mature.

Spațiul necesar creșterii are, de asemenea, o deosebită importanță. El trebuie folosit la maximum în vederea economiei de forță de muncă și sporirii randamentului la fiecare m^2. Asigurarea spațiului optim se realizează prin rărirea larvelor în așa fel încît între ele de o parte și de alta să rămînă un spațiu egal cu lățimea corpului lor. Acesta le va permite accesul la hrană, evitîndu-se aglomerarea care provoacă leziuni ale tegumentului și un consum inegal de frunze. Spațiul se lărgește în conformitate cu vîrsta larvelor după fiecare somn.

Schimbarea așternutului — rest de frunză neconsumată împreună cu excrementele — este una din operațiile cele mai laborioase, care se efectuează în funcție de sistemul de stelaje folosit ca suprafețe de creștere. Pentru aceasta se folosește *hîrtie perforată* cu orificii corespunzătoare grosimii corpului larvelor (fig. 93) sau *plasă de material*

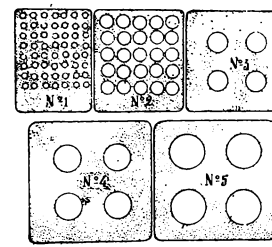


Fig. 93. Modele de hîrtie perforată pentru larve de diferite vîrste.

plastic, care se așază peste larvele ieșite din somn, apoi se administrează frunze proaspete. În cîteva minute, larvele părăsesc vechiul așternut și ajung la hrană. Hîrtia și plasa cu larve și frunze se așază apoi pe o suprafață liberă, unde viermii de mătase vor evolua pînă la următorul somn, realizînd concomitent și rărirea larvelor. Schimbarea așternutului nu se preconizează în prima vîrstă. Ea se face după prima năpîrlire și înainte de a doua, în vîrsta a III-a de trei ori, cea de a IV-a de 6 ori, iar în a V-a zilnic.

Somnurile larvelor reprezintă perioadele de repaos care delimitează cele cinci vîrste larvare, cînd ele se fixează de așternut cu ajutorul pedesspuriilor prin fire subțiri de mătase, luînd poziția caracteristică, cu capul ridicat și cînd are loc năpîrlirea. Primele trei somnuri durează 14—20 ore, iar al IV-lea 30 ore, timp în care practic, nu trebuie hrănite și deranjate, evitîndu-se totodată formarea curenților de aer și lumina puternică.

Hrana constituie factorul principal în creşterea viermilor de mătase, care se aplică după năpîrlire, cînd majoritatea larvelor au ieşit din somn. Cantitatea, calitatea, prepararea, ritmicitatea administrării, conservarea, ca şi schimbarea aşternutului influenţează hotărîtor viabilitatea şi producţia. Principala hrană cunoscută pretutindeni o reprezintă frunzele de dud, a căror valoare nutritivă depinde de gradul lor de maturitate, poziţia pe arbore, momentul recoltării în cursul zilei, metodele de administrare. În acest sens s-a constatat că :

— Prima creştere de viermi de mătase are condiţii optime de hrănire, deoarece există o strînsă corelaţie între evoluţia valorii nutritive a frunzelor şi necesităţile de hrană a larvelor, pe măsura dezvoltării lor. Ulterior, la creşterile repetate de vară—toamnă, numai frunza recoltată de la vîrful lăstarilor regeneraţi poate forma o hrană corespunzătoare larvelor tinere. Cele din ultimele vîrste care au nevoie de o cantitate tot mai mare de hrană întîmpină mari greutăţi.

— Culegerea frunzei să se facă seara, deoarece conţinutul în apă este de 74,6% dimineaţa şi 73% seara.

— Administrarea de frunze tocate în fîşii foarte subţiri în prima vîrstă, mai mari pentru vîrstele a II-a şi a III-a şi de lăstari întregi pentru ultimele două.

Numărul de hrăniri date larvelor corespunde cu vîrsta lor. În general, în primele două vîrste se administrează 8 hrăniri, în vîrstele III şi IV 5—7, iar în vîrsta a V-a 7—8. Suplimentarea cu 1—2 hrăniri în timpul nopţii ridică producţia de gogoşi de mătase.

S-a observat că există o creştere a consumului de hrană în mijlocul fiecărei vîrste şi o reducere a acestuia la intrarea şi ieşirea din somnurile larvare. La mijlocul vîrstei a V-a se instalează aşa numita „furie de mîncare", cînd larvele devorează hrana şi necesită o atenţie deosebită privind administrarea la timp a frunzelor, supravegherea calităţii acestora şi schimbarea aşternutului.

În hrana viermilor de mătase — dar numai în laboratoare — pe lîngă frunze de dud (proaspete, congelate, însilozate, uscate, fierte, pasteurizate), intră frunzele altor specii de plante, hrană sintetică, semisintetică şi diferite furaje.

Substanţele necesare hrănirii, stabilite datorită descoperirii hranei sintetice sînt : apa (75% din masa furajului), glucoza, fructoza, toate dizaharidele, dextrina, celuloza, β sitosterolul, alţi acizi grăşi şi steroliii ; arginina, histidina, izoleucina, leucina, lizina, metionina, fenilanina, prolina, treonina, triptofanul şi valina, vitamina C, acidul aspartic, glutamic, nicotinic, pantotenic, riboflavina, tiamnina, biotina, colina, amestecul de săruri Weson.

Coeficientul de consum al hranei reprezintă raportul procentual al cantităţii de hrană consumată, faţă de totalul administrat şi variază în funcţie de vîrstă şi sezon. Astfel, în creşterile de primăvară este de 16% la vîrsta I-a, 29% la a II-a şi 63—68% la cea de a V-a. În creşterile de toamnă scade pînă la 6,5% la prima vîrstă, 20% la cea de a II-a şi nu depăşeşte 52% la a V-a.

Gradul de digestibilitate a frunzelor este de 1/3 din hrana consumată în primele vîrste și aproximativ 2/3 în vîrsta a V-a.

Efectul productiv al hranei administrate pe parcursul stadiului larvar se stabilește după cantitatea de mătase raportată la 1 kg de frunze de dud (randament economic) și la 1 kg de frunze efectiv consumate de larve (randament nutritiv).

În practica sericicolă, rezultatul final al activității se exprimă prin cantitatea de frunze necesară pentru obținerea unui kg de gogoși de mătase.

ÎNGOGOȘAREA are loc la sfîrșitul stadiului larvar, cînd larvele încetează să se hrănească, uneori se retrag la marginea suporturilor, caută trei puncte de sprijin, lasă în urma lor fire de mătase, rotesc capul în căutarea condițiilor corespunzătoare, elimină conținutul tubului digestiv, capătă o nuanță translucidă, iar corpul se scurtează. Observarea începutului îngogoșării are o deosebită importanță, deoarece în lipsa unui sistem adecvat, larvele migrează sau construiesc gogoși între frunzele din așternut (inferioare calitativ) și uneori depun mătasea sub formă de covor. Condițiile optime indicate pentru îngogoșare sînt : temperatura de 25°C, umiditatea 60%, lumina difuză — portocalie, excluderea curenților de aer și nederanjarea larvelor. Se urmărește obținerea unor *gogoși fără defecte* (fig. 94), care să permită extra-

Fig. 94 Diferite forme de gogoși ; a — centurată ; b — ușor centurată ; c — elipsoidală ; d — ovală ; e — rotundă

gerea firului întreg conținut în peretele lor. În acest scop se folosesc diferite *sisteme de suporturi pentru îngogoșare* ca : arici de paie sau din material plastic, snopi de măturică și rapiță, ramuri de stejar și conifere, vreji de soia sau de mazăre, talaș, pungi, grătare de lemn, plăci din carton dispuse pe un ax, cuiburi sau celule din placaj sau carton, rame „tip rotativ" etc. (fig. 95). Acestea trebuie să fie suficiente pentru ca larvele să nu se îngrămădească și să urzească gogoși duble. De asemenea, este necesar să se așeze în așa fel, încît să permită admi-

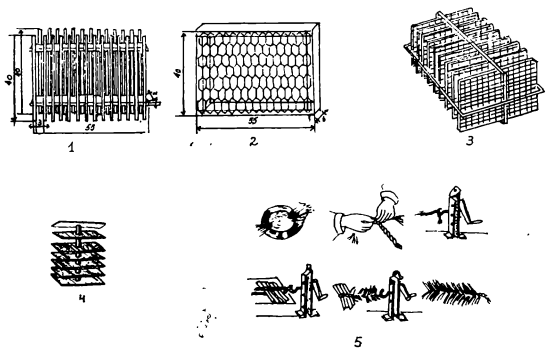


Fig. 95. Sisteme de îngogoşare : 1 — grătar de lemn ; 2 — celule din carton ; 3 — rame „tip rotativ" ; 4 — plăci din carton dispuse pe un ax ; 5 — arici de paie.

nistrarea hranei şi schimbarea aşternutului larvelor care încă nu îngogoşează şi pentru care se sporeşte materialul de îngogoşare pe măsură ce ele se pregătesc. În mod obişnuit, îngogoşarea tuturor larvelor se face în 3—4 zile, iar larvele care nu au îngogoşat în acest timp se mută pe alte suporturi, se îngrijesc în continuare, iar gogoşile se recoltează cu o săptămînă mai tîrziu.

Recoltarea gogoşilor se efectuează după 7—8 zile de la îngogoşare, moment corespunzător întăririi crisalidei din interior şi care se deduce după zgomotul „sec" perceput prin scuturarea gogoşilor. Strîngerea gogoşilor se realizează mecanizat de pe suporturile tip arici şi manual de pe celelalte sisteme. Ea se face de jos în sus, deoarece dacă s-ar începe de la patul de sus, larvele moarte ar murdări gogoşile de pe paturile de jos. Se culeg mai întîi exemplarele moarte, gogoşile neterminate şi cele puternic pătate, pentru evitarea degradării celor curate. Îndepărtarea scamei de la suprafaţa gogoşilor se face, de asemenea, mecanizat sau manual, procedîndu-se totodată şi la sortarea gogoşilor pe categorii, în funcţie de calitate şi anume :

— calitatea I, reprezentată prin gogoşi normale, de culoare, formă, mărime caracteristice rasei sau hibridului, fără pete, cu peretele consistent, toate fiind filabile ;

— calitatea a II-a A cuprinde gogoși cu mici defecte (pete exterioare, cicatrici de mică suprafață) și duble, cu învelișul mai puțin consistent, filarea făcîndu-se în proporție de 80—85%;

— calitatea a II-a B include gogoși cu peretele subțire și defecte mari, care se filează în proporție de circa 60%;

— calitatea a III-a este alcătuită din gogoși cu aspect diform, perete mătăsos perforat, cantități mari de scamă, nefilabile.

După sortare, gogoșile se ambalează în coșuri de nuiele sau lăzi perforate, cu capacitatea de maximum 25 kg.

Coconii (gogoșile) cu defecte (fig. 96) nu pot fi utilizați în filatură. Principalele defecte sînt următoarele :

— *coconi dubli* care conțin 2—3 larve, iar firul este depus neregulat și nu se poate desface ;

— *diformi,* cu formă neregulată ;

— *pufoși,* cu aspect de vată ;

— *pătați,* conțin larve și crisalide putrezite ;

— *ruginiți,* pătați de dejecțiile larvei bolnave ;

— *calcinați,* în care larva a fost omorîtă de o micoză ;

— *de atlas,* cu o parte din perete neted și lustruit, fiind țesuți pe o suprafață netedă ;

— *neterminați,* cu pereții semitransparenți ;

— *perforați,* cu o deschizătură apicală.

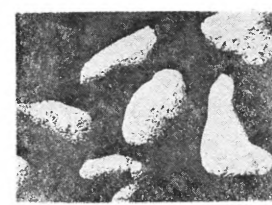


Fig. 96. Coconi (gogoși) cu defecte.

Coconii defectuoși pot fi transformați în vată de mătase, care se toarce, servind la fabricarea țesăturilor de șantung.

Etuvarea gogoșilor (distrugerea crisalidei din interior) în *cuptoare de tip Simplex* se face în termen cît mai scurt după preluare, pentru a preveni apariția fluturilor.

După această operație, gogoșile se usucă în strat subțire, în încăperi bine aerisite. Umiditatea condiționată pentru predarea și recepția gogoșilor trebuie să fie de 11%.

Devidarea. La filatură gogoşile sînt triate pe dimensiuni şi calităţi ; cele destinate devidării sînt dirijate spre fierberea centralizată, apoi la maşini de devidat, după care firul obţinut se „avivează" şi „emulsionează", se redeapănă, se finisează, se ambalează şi depozitează. Instalaţia de fierbere prezintă 7 sectoare : omogenizarea umidităţii gogoşilor cu aer cald (la 74—80°C) ; înmuierea lor în apă caldă (70—75°C) ; aburirea în vapori de apă de 86—94°C şi 0,2—0,275 atmosfere presiune ; permeabilizarea şi pătrunderea apei în gogoşi în proporţie de 50—60% din capacitatea lor internă (75—90°C) ; fierberea cu aburi supraîncălziţi (98—104°C şi 0,175—0,275 atmosfere) ; omogenizarea fierberii şi pătrunderea apei în gogoşi în proporţie de 93- 95% din capacitate, prin trecerea succesivă în apă de : 99—98—95—90—85—80°C ; finisarea fierberii trecînd gogoşile prin apă de 55—60°C.

3.1. PRODUSE ŞI DEŞEURI

— *Firul de mătase* este principalul produs obţinut în urma creşterii viermelui de mătase al dudului, alcătuit din fibroină, sericină, substanţe colorante (0,05%) şi grăsimi (3—4%). El se caracterizează prin : lungime, rezistenţă, elasticitate, luciu, proporţia de sericină/fibroină, ductibilitate, titlu şi fineţe, elemente de care trebuie să ţină seama amelioratorii de rase şi hibrizi, producătorii de ouă şi în final crescătorii.

— *Setolina (crinul de Florenţa)* se extrage din glandele sericigene ale larvelor din ultima vîrstă şi reprezintă un excelent fir chirurgical, resorbindu-se odată cu vindecarea plăgii.

— *Crisalidele* formează circa 70% din masa totală a gogoşilor uscate, constituie un excelent furaj bogat în grăsimi şi proteine şi servesc pentru extragerea unor substanţe cu proprietăţi citostatice.

— *Aşternutul* se poate utiliza ca îngrăşămînt sau după o prelucrare specială, ca furaj pentru animale. Din 100 kg frunze administrate larvelor rezultă, la un loc cu dejecţiile acestora, circa 40 kg aşternut (gunoi), bogat în substanţe azotate.

3.2. CREŞTEREA VIERMILOR DE MĂTASE ÎN SISTEM INDUSTRIAL (INTENSIV)

În condiţiile unei sericiculturi moderne de tip intensiv, creşterea viermilor de mătase are loc în complexe (ferme) sericicole dotate cu : *plantaţii de 50 ha dud* din soiurile cele mai productive, *construcţii* prevăzute cu *utilaje* corespunzătoare pentru creşterea larvelor eclozionate din cel puţin 10 kg de ouă pentru fiecare din cele 5—6 creşteri succesive planificate anual, *personal* tehnic şi auxiliar.

Cantitatea de gogoşi de mătase obţinută la hectarul de plantaţie de dud într-un complex depăşeşte 800 kg, reprezentînd o recoltă anuală de zeci de tone de gogoşi, consumul de forţă de muncă fiind de maximum două ore pentru fiecare kilogram.

Etapele fluxului tehnologic privind creşterea viermilor de mătase într-un complex sericicol sînt :

— incubaţia ouălor ;

— creşterea centralizată a larvelor în primele trei vîrste ;

— creşterea larvelor mature în adăposturi uşoare, cu capacitate mare ;

— transferarea larvelor apte pentru îngogoşare în spaţii special amenajate ;

— condiţionarea şi expedierea gogoşilor.

3.3. CREŞTEREA VIERMILOR DE MĂTASE ÎN CADRUL ŞCOLILOR, C.A.P.-URILOR ŞI GOSPODĂRIILOR POPULAŢIEI

În aceste cazuri, creşterea viermilor de mătase se poate face în încăperile existente, eliberate temporar şi amenajate în scop sericicol. Ele trebuie alese în aşa fel, încît să poată asigura factorii necesari creşterii şi dezvoltării larvelor, precum şi îngogoşarea.

Este recomandat ca *localul* destinat creşterii să fie amplasat pe locuri mai ridicate, pentru ca în timpul ploilor, apa să nu pătrundă în interior. În apropiere să nu existe platforme de gunoi, iar terenul din jur să fie curat, lipsit de buruieni. Pentru *încălzire* sînt necesare sobe de zid, care pot asigura temperatură constantă. Se evită sobele din fier, deoarece se încălzesc şi se răcesc repede, creînd fluctuaţii mari de temperatură. *Aerisirea* se realizează prin deschideri făcute în perete sau prin folosirea uşilor şi ferestrelor. Pentru asigurarea *luminii* se recomandă ca suprafeţele ferestrelor să reprezinte 10% din cea a încăperii.

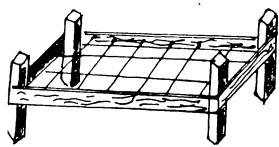
Sistemul de stelaje folosit ca suprafeţe de creştere, trebuie să asigure în primul rînd spaţiul corespunzător larvelor. Stelajele se prezintă sub o varietate de tipuri, determinată de posibilităţile crescătorului şi tradiţia locală. Cele mai obişnuite sînt *paturile simple* sau *suprapuse* pe 3—4 nivele şi *cu picioare fixe*, confecţionate de obicei din lemn (fig. 97 a, b). Practice sînt şi planurile înclinate, unite într-un unghi de 45° în partea superioară, numite şi *capre* (fig. 98), *rafturile suspendate sau poliţe* (fig. 99) şi sistemul cu *bare* din lemn sau metal (fig. 100), care permit lărgirea succesivă a suprafeţei de creştere.

Se acordă o atenţie deosebită *hrănirii larvelor* în vederea realizării procesului de îngogoşare în condiţii optime, care să asigure minimum 2,5 kg gogoşi pentru larvele provenite dintr-un gram de ouă.

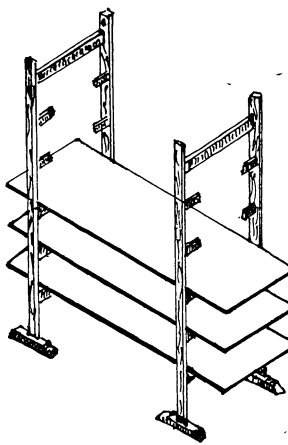
Sînt obligatorii curăţenia şi dezinfecţia încăperilor şi a utilajelor de creştere (tabelul 1).

3.4. CREŞTERI SUCCESIVE (REPETATE) DE VIERMI DE MĂTASE

Creşterea viermilor de mătase pe întreaga perioadă de vegetaţie a dudului asigură obţinerea a cel puţin cinci serii de larve şi tot atîtea recolte de gogoşi într-un an, contribuind la sporirea producţiei de mătase.



a



b

Fig. 97. — Paturi pentru creşterea viermilor de mătase : a — simplu ; b — cu picioare fixe.

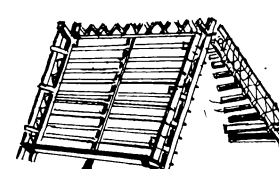
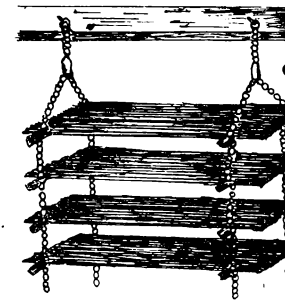


Fig. 98. Dispozitiv de creştere pe planuri înclinate (capre).

Fig. 99. Rafturi suspendate (polițe).



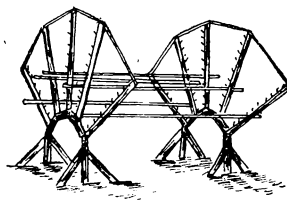


Fig. 100. Sistemul de creștere cu bare

Principalii *factori* care condiționează reușita creșterilor succesive din primăvară pînă în toamnă sînt :

— existența unei plantații intensive de dud, de la care prin tehnologii speciale să se obțină frunză tinără ;

— spațiu corespunzător ;

— material biologic rezistent la condițiile de temperatură și hrănire din lunile de vară—toamnă, hibrizi adaptați diferitelor zone naturale ale țării, cu durată scurtă a stadiului larvar și viabilitate sporită ;

— dezinfecție riguroasă a localului și utilajelor folosite.

În țara noastră, aceste creșteri se desfășoară în funcție de zona geografică : în regiunile de șes, pînă în luna septembrie (inclusiv), iar în cele colinare toată perioada de vară, întrerupîndu-se mai devreme, din cauza pericolului brumelor care pot compromite baza furajeră. S-au crescut experimental, în perioada mai—octombrie, pînă la 8 serii, iar în producție se practică 2—3 : I serie, care începe la sfîrșitul lunii aprilie, a II-a la interval de 20 zile, iar a III-a la jumătatea

Tabelul 1

Dezinfecția localului și instrumentarului destinat creșterii viermilor de mătase

(Spătaru C. și colab.)

Substanța dezinfectantă	Doza	Tehnica dezinfecției	Observații
Formalină	Soluție 4% cîte 250 g la 1 m^2 suprafață de dezinfectat	La 1 litru de formalină se adaugă 9 litri apă. Această soluție se împrăștie cu ajutorul unui vermorel pe tavanul, pardoseala, ușile, ferestrele și întreg interiorul localului, pînă la udarea completă. În tot acest timp se menține o temperatură de 24—26°C. Încăperea se închide bine timp de 36 ore, apoi se aerisește.	Operația se efectuează în scop profilactic cu 7 zile înainte de începerea creșterii. Se lucrează cu masca de gaze. Dezinfecția începe din colțul cel mai îndepărtat al camerei, spre ușă.
Monocloramină	Soluție 2% cîte 1 litru la 3—4 m^2 suprafață de dezinfectat	La 200 g monocloramină se adaugă 10 litri apă și 200 g substanță activă (de exemplu clorura de amoniu). Se procedează la fel ca și în cazul formalinei. Încăperea se ține închisă 12—20 ore, apoi se aerisește.	Operația se execută cu 1—2 zile înainte de începerea creșterii. Se lucrează cu masca de gaze.
Sulf	30—40 g la 1 m^2 încăpere	Batoanele de sulf se așază peste cărbuni aprinși în vase metalice. Se adaugă la 20 părți sulf, o parte silitră. Dezinfecția se efectuează la cel puțin 15°C, durînd 10—12 ore, cu încăperea închisă.	Se folosește în special cînd există pericol de îmbolnăvire cu muscardină. Se recomandă precauțiuni contra incendiilor.

lui august, evitîndu-se perioada 15 iulie — 15 august, din cauza căldurilor excesive.

În condițiile complexelor sericicole, pentru creșterile de vară sînt recomandate *localuri* din cărămidă, panouri prefabricate sau barăci. Acestea trebuie prevăzute cu *ventilatoare* și posibilități de *umezire* a aerului, prevenind pericolul supraîncălzirii și uscăciunii din interior.

În sistemul gospodăresc, creșterile repetate se efectuează în *magazii* sau *grajduri* pregătite corespunzător. Pereții din chirpici țin răcoare și păstrează umiditatea necesară mai ales dacă adăpostul este umbrit de arbori înalți, care opresc pătrunderea directă a razelor solare prin ferestre.

Incubația ouălor pentru primele două serii se face după metoda creșterii treptate a temperaturii și se folosesc ouă diapauzate provenite din ultima creștere a anului precedent. În seria a III-a și celelalte se întrebuințează ouă provenite din creșterile anului respectiv, stimulîndu-se cu HCl, prin metoda temperaturii constante.

Pentru evoluția normală a larvelor, *temperatura* nu trebuie să depășească 25°C, iar *umiditatea* să oscileze între 70 și 75%. *Hrana* trebuie dată în porții mai mici și mai dese (la interval de 2 ore, obligatoriu și noaptea). Frunza să fie foarte fragedă, mai ales pentru primele două vîrste.

În caz de secetă, frunza necesară larvelor din vîrstele III și IV se poate umezi în prealabil, introducîndu-se în găleți cu apă, procedeu ce nu se mai aplică în vîrsta a V-a. Frunza se mai poate păstra proaspătă, prin acoperirea larvelor în timpul zilei cu folii de polietilenă.

Ingogoșarea se face în camere și pe stelaje special amenajate utilizîndu-se de obicei arici (din paie sau material plastic) și suporturile de tip rotativ.

AMELIORAREA viermilor de mătase constă într-un ansamblu de lucrări privind îmbunătățirea potențialului genetic al raselor și hibrizilor care se folosesc în producția sericicolă, inclusiv producerea de ouă.

Principalele *obiective* sînt :

— crearea de rase și linii noi de viermi de mătase și perfecționarea celor existente ;

— crearea de hibrizi, prin încrucișarea raselor cu valoare combinativă ridicată ;

— înmulțirea raselor și hibrizilor în vederea obținerii ouălor industriale destinate producției sericicole.

Metodele de ameliorare aplicate în sericicultură, pentru atingerea acestor obiective constau în : *selecție, hibridare, consangvinizare* și *provocarea mutațiilor*.

Indiferent de metoda folosită, la baza acțiunii de ameliorare stă cunoașterea temeinică a materialului biologic de la care se pornește. Rasele de viermi de mătase au anumite caracteristici morfologice, biologice și productive care trebuie evidențiate și dacă interesează, consolidate, practicînd sistemul creșterilor pe bază de linii și familii.

Printr-o activitate permanentă, pe baza celei mai moderne tehnici de lucru, a unei documentații complete, prin cercetări interdisciplinare și cu mijloace suficiente este de așteptat să ajungă în marea producție hibrizi cu gogoși grele, mătase multă, foarte receptivi la condițiile optime de hrană și întreținere.

Avînd un număr mare de descendenți și interval redus între generații, viermii de mătase se folosesc larg în studii genetice.

PRODUCEREA OUĂLOR „SEMINȚEI" de viermi de mătase *(materialul de reproducție)* se realizează în cadrul unor unități de profil, sub controlul direct al specialiștilor de la Stațiunea centrală pentru producție și cercetare sericicolă — Băneasa.

În țara noastră se produc trei categorii de ouă :

— *superelită*, provenite dintr-un fond de rase valoroase pe care îl are sectorul de cercetare al stațiunii centrale ;

— *elită*, realizate în cadrul unităților sericicole autorizate, care înmulțesc materialul superelită, fie sub formă de rasă curată, fie de hibrizi simpli ;

— *industriale*, obținute din înmulțirea materialului elită în fermele sericicole specializate pentru producerea de ouă industriale de origine hibridă sau polihibridă, care se repartizează pe teren, pentru creșterile curente.

Începînd cu un material inițial extrem de redus cantitativ, dar cu mare valoare biologică, în mai mulți ani acesta se înmulțește în vederea obținerii ouălor industriale, care se distribuie în teren.

BOLILE viermilor de mătase afectează producția de gogoși de mătase, diminuînd-o anual în țara noastră cu aproximativ 10%. Ele sînt de două feluri : contagioase și necontagioase.

3.5. BOLILE CONTAGIOASE

3.5.1. PARAZITOZE

Pebrina atacă toate stadiile de dezvoltare ale viermelui de mătase și este provocată de protozoarul *Nosema bombycis*. Primele semne ale bolii sînt ecloziunea anormală și mortalitatea ridicată a larvelor. Tegumentul lor se colorează la început în roz-cenușiu, apoi prezintă pete negre neregulate, de mărimi diferite, asemănătoare boabelor de piper, indicînd alterații profunde, care se mențin după năpîrlire (fig. 101). Ele devin agitate, se hrănesc puțin și frecvent mor înainte de a năpîrli.

Fig. 101. Larve bolnave de pebrină.

Dacă sînt infestate în ultimele două vîrste, ajung să țeasă coconi mici, diformi. Fluturii sînt mai mici, au longevitate scăzută, pete negre pe aripi și abdomen, se împerechează greu și depun ouă puține, ce conțin

sporii de Nosema. Prevenirea se face utilizînd pentru creştere numai ouă selecţionate şi prin înlăturarea posibilităţii infectării din mediul extern (dezinfectarea localului şi utilajului sericicol, cu formol 2% sub formă de pulverizări fine sau cloranfenicol 2%).

3.5.2. MICOZE

Muscardina este produsă de ciuperca *Botrytis (Beauveria) bassiana*, îndeosebi la larve. Ele pierd pofta de mîncare şi mobilitatea, devin roşiatice, în jurul stigmelor şi a pedesspuriilor prezintă pete negricioase şi mor după 2—12 zile de la îmbolnăvire. Peste cîteva ore, corpul lor devine negru-roşcat, iar în ziua următoare se acoperă cu hifele purtătoare de sporii ciupercii, ca un praf alb (fig. 102). Se combate prin

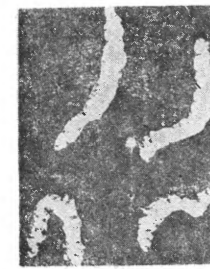


Fig. 102. Larve bolnave de muscardină.

izolarea larvelor bolnave, arderea aşternutului, evitarea umidităţii, dezinfecţia localului şi a inventarului cu acid acetic glacial sau prin pulverizarea unei soluţii de formalină în concentraţie de 3%.

3.5.3. BACTERIOZE

Septicemia afectează larvele, crisalidele şi adulţii, putînd distruge în cîteva zile întreaga creştătorie. Este produsă de agenţii patogeni: *Proteus vulgaris, Bacterium turchestanicum, B. prodigiosum, Flavobacterium, Bacillus apisepticus* ş.a., care pătrund în organism prin leziuni tegumentare. Larvele bolnave nu se mai hrănesc, devin imobile, vomită fragmente de frunze nedigerate şi suc gastric, excrementele sînt moi sau lichide, cafenii, capătă o culoare nedefinită, iar după 2—3 zile mor (fig. 103). Prevenirea bolii se realizează prin: rărirea larvelor, izolarea şi distrugerea celor bolnave, schimbarea aşternutului, dezinfecţia cu o soluţie de formol 1%.

3.5.4. VIROZE

Flaşeria (moleşala) este produsă de virusul *Borrellina flacheriae*, care se dezvoltă în tubul digestiv al larvelor din ultima vîrstă. Acestea

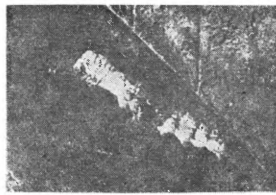


Fig. 103. Larvă moartă de septicemie

inițial sînt agitate, nu mai consumă hrană, apoi se retrag la marginea suportului de creștere, elimină din cavitatea bucală un lichid de culoare închisă, au diaree, mor, iar corpul lor devine negricios, moale, se descompune repede și degajă un miros neplăcut, înțepător (fig. 104). Pentru

Fig. 104. Larve moarte de flașerie pe ramuri.

prevenirea acestei boli se iau următoarele măsuri : asigurarea condițiilor optime în tot timpul creșterii, hrănirea larvelor cu frunză de bună calitate și cantitate îndestulătoare, selecția de rase și hibrizi, polihibrizi rezistenți, mai ales pentru creșterile de vară și vară-toamnă.

Poliedria (gălbenarea) este provocată de virusul *Borrellina bombycis,* mai frecvent la larvele din ultima vîrstă. Acesta poate fi observat în hemolimfa și țesuturile larvelor bolnave, sub forma unor corpusculi poliedrici, de unde și denumirea bolii. Larvele sînt neliniștite, nu se hrănesc, devin imobile, au corpul îngroșat, iar tegumentul întins, lucios, se rupe la cea mai ușoară atingere lăsînd să se scurgă hemolimfa tulbure și capătă o culoare galbenă de unde și denumirea de gălbenare (fig. 105). Ele mor după 1—2 zile. Prevenirea se face prin : distrugerea larvelor bolnave, asigurarea unei densități optime, dezinfecția cu soluție de formalină 3%.

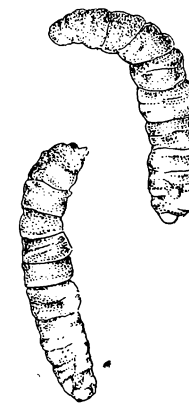


Fig. 105. Larve bolnave de poliedric.

Anemia infecțioasă (macilența) se datorește virusului *Borrellina flacheriae,* dublat de o infecție secundară cu *Streptococcus bombycis* și afectează larvele începînd cu vîrsta a III-a. Boala evoluează lent, larvele devenind uneori transparente, alteori slăbind, iar după moarte se deshidratează, se mumifică și capătă o culoare închisă. Cînd apare în vîrsta a V-a, ele țes gogoși cu conținut redus de mătase, dar nepătate.

3.6. BOLILE NECONTAGIOASE

Intoxicațiile alimentare se produc prin respirația larvelor într-un mediu în care s-au aplicat stropiri sau prăfuiri cu pesticide, prin ingestia frunzelor tratate cu diferite substanțe toxice a căror remanență nu a expirat și a unor frunze atacate de bacterioze sau viroze. Se manifestă în general prin spasme, mișcări violente ale părții anterioare a

corpului, dispariția poftei de mîncare, vomări, reducerea dimensiunii corpului. Larvele mor în scurt timp, luînd forma de S. Preventiv, trebuie respectate următoarele măsuri : să nu se folosească timp de un an încăperile în care s-au aplicat pesticide organo-fosforice ; să se anunțe data și locurile în care s-au aplicat pesticide ; după 15—20 zile de la tratamentele chimice din culturile agricole, livezi, plantații forestiere, să se culeagă frunze de la duzii din apropiere și să se hrănească un lot redus de larve, observîndu-se dezvoltarea lor.

Bolile funcționale se caracterizează prin vomări și diaree, uneori și prin constipații. După moarte, larvele își păstrează un timp oarecare elasticitatea și culoarea.

Cauzele mecanice sînt : căderea de pe paturile de creștere, rănirea tegumentului, strivirea larvelor la administrarea hranei sau la schimbarea așternutului.

3.7. DĂUNĂTORII

Sînt reprezentați prin animale, care transportă în crescătoriile de viermi de mătase sporii diferiților agenți patogeni, răpesc ouă și larve mici sau mari și distrug coconii. Printre acestea se înscriu :

Furnicile : Lasius niger (furnica neagră de grădină), *Formica rufa* (furnica roșie de pădure), *F. rufibarbis* (furnica mare cu mandibulele roșii) reprezintă cel mai mare pericol pentru larve, începînd din primăvară pînă toamna. Ele atacă larvele mici, iar cu ajutorul mandibulelor le rod tegumentul, apoi consumă hemolimfa și țesuturile, după ce le aduc în cuibul lor. Se combat prin : distrugerea mușuroaielor cu insecticide, înconjurarea picioarelor stelajelor cu un strat de cenușă sau cu un inel de vată sau cîrpe stropite cu petrol și prin momeli otrăvite.

Viespile — reprezintă dăunători importanți pentru larve, pe care le înțeapă, le suge hemolimfa, le omoară, apoi le consumă sau le transportă în altă parte. La larvele de Bombyx mori, s-a remarcat specia *Vespa media*, care-și face cuibul sub acoperișul caselor sau în păduri. Se combate prin distrugerea cuiburilor primăvara și momeli otrăvite din carne cu arseniat de sodiu în concentrație de 2—3%.

Musca domestica poate fi considerată un dăunător, deoarece contribuie la răspîndirea bolilor prin vehicularea unor agenți patogeni de la o crescătorie la alta. Împotriva ei se folosesc site la ferestre și benzi adezive în încăperi.

Greierele de casă (Gryllus domesticus) atacă larvele și se combate prin momeli otrăvite.

Pagubele aduse în crescătorii de coleopterul dăunător *Dermestes lardarius*, care atacă în special coconii bolnavi sau crisalidele moarte, se îndepărtează prin izolarea acestora și dezinfectarea frecventă a localului.

Șoarecii și *șobolanii* distrug larvele noaptea. Combaterea lor se face prin deratizarea încăperilor înainte de aducerea larvelor și aplicarea curselor și a momelilor otrăvite.

Împotriva *broaștelor* se construiesc la uși praguri mai înalte.

Pătrunderea *păsărilor* (rîndunele, vrăbii) este oprită prin site de sîrmă în dreptul ferestrelor.

3.8. BAZA FURAJERĂ SERICICOLĂ

Are o deosebită importanță în creșterea rentabilității sericiculturii, aceasta depinzînd de producția de frunze și de calitatea lor.

Pînă în prezent se utilizează numai *frunzele de dud (Morus alba, M. nigra, M. rubra, M. tatarica, M. indica, M. multicaulis, M. latifolia, M. bombycis.* Cel mai răspîndit este *Morus alba* cu varietățile *pendula* și *piramidalis.*

Soiurile cele mai valoroase pentru sămînță hibridă de dud din țara noastră sînt : Calafat, Eforie, Galicea, Orșova, Azori, Cattaneo, Kokuso, Inchinose, Ucraina, Bulgaria.

Pe lîngă producțiile de frunză la ha (15—20 tone), soiurile de dud recomandate pentru sericicultura de tip industrial, se remarcă prin : rezistență sporită la ger, reacție pozitivă la administrarea îngrășămintelor, plasticitate.

Metodele de recoltare a frunzelor influențează mult producția și longevitatea plantației. Culegerea manuală, frunză cu frunză, păstrînd jumătate din pețiol este cea mai inofensivă, dar productivitatea este foarte scăzută și imposibilă în fermele specializate. Tăierea ramurilor este mult mai economicoasă, dar contribuie la diminuarea longevității pomului. În ultimul timp s-au construit diferite modele de mașini, prin a căror perfecționare se va înlocui, în viitor, munca manuală de recoltare a frunzelor.

BOLILE dudului sînt : *bacterioza, pătarea brună a frunzelor, făinarea, putregaiul alb al rădăcinilor, piticirea, cloroza, boala pustulelor roșii de pe ramuri.*

DĂUNĂTORI : omida păroasă a dudului (Hyphantria cunea Drury). Este o specie polifagă și se combate prin adunarea și arderea ramurilor cu cuiburi de omizi, sau, în invazii, prin tratamente chimice.

4. APIS MELLIFICA L. : ÎNGRIJIRE, CREȘTERE, ÎNMULȚIRE, RESURSE MELIFERE, PRODUSE APICOLE, BOLI ȘI DĂUNĂTORI

Avantajele multiple aduse economiei umane de albina meliferă au impus studii referitoare la ameliorarea ei și la stabilirea celor mai potrivite tehnologii de întreținere și exploatare. În acest sens prezentăm unele aspecte legate de organizarea stupinelor, îngrijirea rațională a familiilor, valorificarea superioară a produselor apicole, profilaxia și combaterea bolilor și dăunătorilor, metodele de selecție, înmulțire și îmbunătățire a bazei melifere. Acestea sînt necesare tuturor celor ce îndrăgesc îndeletnicirea de apicultor și îndeosebi profesorilor de biologie, care trebuie să întrețină pe lîngă școli, familii de albine, ca material intuitiv valoros în predarea științelor naturii.

Pentru buna desfășurare a activității într-o stupină și obținerea unor rezultate valoroase, se recomandă să existe *INVENTARUL APICOL* adecvat. Acesta se compune din următoarele utilaje, unelte și materiale : *stupi, mască* (fig. 106 a, b, c), *salopetă* din doc, *șorț* cau-

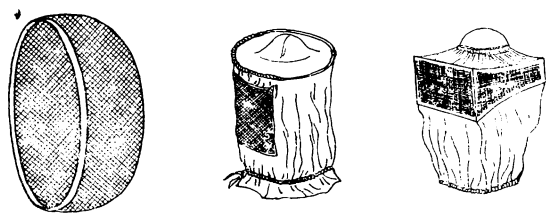


Fig. 106. Mască apicolă : a — tip calotă (fără pînză) ; b — cu pălărie ; c — pliantă.

ciucat, *cizme cauciucate, halat alb, afumător* (fig. 107), *daltă* (fig. 108), *perie* (fig. 109), *faguri, dulap* pentru faguri (fig. 110), *scaun* (fig. 111), *adăpător, hrănitoare, cîntar* apicol, *pulverizator, arzător* de pucioasă, *cabană* pentru stupărit pastoral, *perforator* rame, *calapod* și *pinten* pentru fixarea fagurilor artificiali, *dispozitiv de însîrmare a ramelor*,

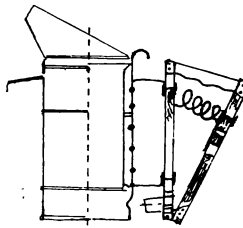


Fig. 107. Afumător.

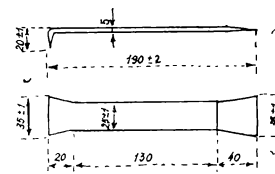


Fig. 108. Daltă apicolă.

Fig. 109. Perie apicolă.

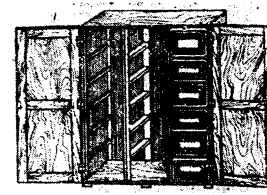


Fig. 110. Dulap pentru faguri.

Fig. 111. Scaun.

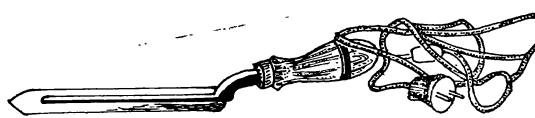


Fig. 112. Cuțit pentru descăpăcit faguri.

creion pentru lipit faguri artificiali în rame, *lădiță* pentru transportat rame, *cuțit* (fig. 112) și *furculiță* (fig. 113) pentru descăpăcit faguri, *masă* (fig. 114) și *tavă* pentru descăpăcit, *extractor manual* și *centrifugă* (fig. 115) pentru miere, *maturator, strecurătoare* (fig. 116), *bidoane, laboratoare mobile* pentru extracția mierii, *topitor de ceară solar* și

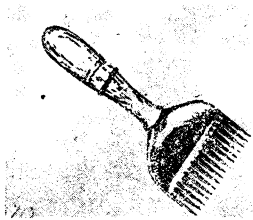


Fig. 113. Furculiță pentru descăpăcit faguri

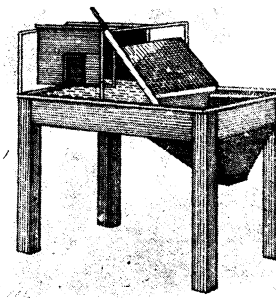


Fig. 114. Masă pentru descăpăcit faguri.

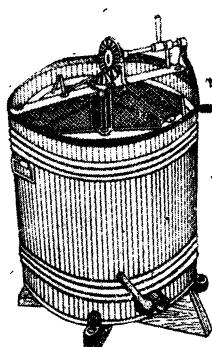


Fig. 115. Centrifugă pentru miere.

cu aburi, *ibric* pentru topit ceara, *tăviță* pentru ceara topită și pentru apa de răcire, *ramă clăditoare* de ceară, *presă* pentru stors ceara, *spatulă* pentru transvazat larve (fig. 117), *dopuri* pentru fixarea botcilor, *botci artificiale*, șabloane pentru confecționarea botcilor artificiale, *cuțit* pentru scurtarea botcilor, *șipci* de creștere, *rame port botci*, *diafragme* și *rame* despărțitoare, *colivii* de eclozionare a mătcilor și de introducere a lor (fig. 118), *aparat* pentru marcat mătci, *nuclee* de împerechere, *bor-*

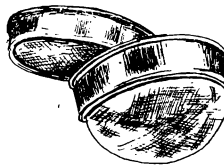


Fig. 116. Strecurătoare dublă pentru miere.

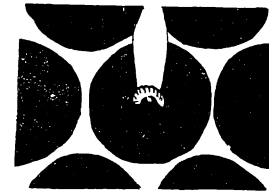
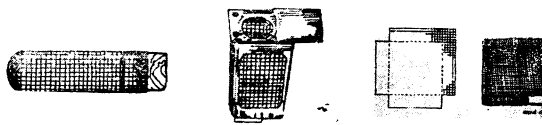


Fig. 117. Transvazarea larvelor.



a *b* *c*

Fig. 118. Colivii pentru introdus matca: a — tip Miller; b — tip Titov; c — tip capac.

cane brune pentru lăptișorul de matcă, *colector* și *uscător* de polen, *aspiratoare mobile* pentru polen, *frigider* sau *termos* pentru conservare, *spirtieră* sau *reșou*, *site de ventilație*, *recipiente* din *sticlă*, *filtru* din fire de mătase, *pipete*, *stative*, *ambalaje*, *zahăr*, *miere*, *medicamente* etc.

STUPUL este cel mai important utilaj apicol cu rol de adăpost pentru albine, depozit al rezervelor de hrană, recoltă și mijloc pentru transport. El trebuie să îndeplinească o serie de calități : să aibă volum util mare, să fie simplu, adaptabil în funcție de populația coloniei, transportabil, bun izolator termic, fonic și hidric, rezistent, prevăzut cu toate accesoriile necesare unei creșteri intensive, mecanizabil, automatizabil. În construcția stupilor cea mai largă utilizare a avut-o cherestcaua de rășinoase, protejată în majoritatea cazurilor de vopsele rezistente.

După modul în care se mărește cuibul, stupii se clasifică în verticali, mixti și orizontali.

STUPII VERTICALI valorifică felul de comportare a albinelor în condiții naturale și principiile care stau la baza dezvoltării și activității lor productive : dezvoltarea pe verticală a familiilor, depozitarea rezervelor de hrană — miere și păstură — deasupra zonei de creștere a puietului, extinderea în sus a suprafeței de depunere a ouălor de către matcă.

Stupii au ramele suprapuse pe 2 sau mai multe rînduri, în interiorul aceleeași cutii sau în corpuri etajate, deschiderea deasupra sau lateral, iar ramele din interior perpendiculare pe peretele urdinișului sau paralele cu acesta.

Stupul multietajat STAS 8128—68 (fig. 119 A, B) se compune din : fund, corpuri, rame pentru faguri, rama de ventilație, podișor, podișor separator, hrănitor, capac, sistem de împachetare, blocuri de reducere a urdinișului și șipca de închidere a acestuia. Construcția simplă, unitară

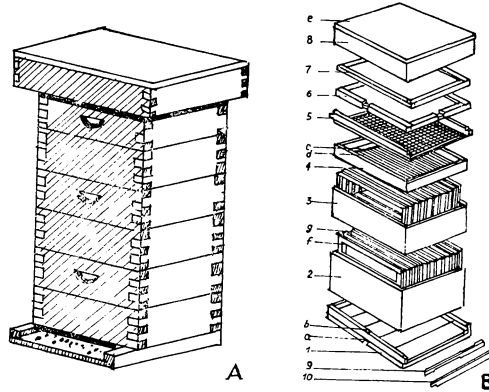


Fig. 119. A — stupul multietajat ; B — părțile componente : 1 — fund ; a — scobitură pentru fixarea știftului în tije ; b — canal pentru tije ; 2 — corpul ; 3 — magazin ; 4 — ramă pentru hrănitor ; c — tavă hrănitor ; d — plutitor ; 5 — ramă de ventilație ; 6 — podișor separator ; 7 — podișor ; 8 — capacul ; e — acoperișul de tablă ; 9 — blocul pentru urdiniș ; 10 — închizător de urdiniș ; f — diafragma ; g — rame.

satisface pe deplin cerințele biologice ale albinelor și permite omului să le dirijeze cu ușurință dezvoltarea. Ramele fiind așezate în corpuri suprapuse, dau posibilitatea aplicării unor metode care accelerează ritmul de dezvoltare a familiilor de albine, iar în condiții corespunzătoare asigură depozitarea rezervelor de hrană și recolte de calitate superioară. La transport face posibilă aplicarea procedeelor moderne de paletizare, iar albinele au condiții adecvate de existență. Permite mecanizarea avansată a operațiilor de extracție a mierii. Se recomandă ca un stup al viitorului.

Stupul RA 1001 oferă condiții bune pentru dezvoltarea familiilor de albine și valorificarea culesurilor de nectar, polen etc. Are o construcție compactă robustă și este format din : fund, corp cu rame de cuib de 435 x 300 mm, unul sau două magazine cu rame de recoltă de 435 x 162 mm, podișor, capac, scîndură de zbor și diafragmă.

Stupul vertical realizat de I.C.A. este alcătuit din : fund, corp, magazin, podișor hrănitor, rame de cuib de 435 x 300 mm, rame pentru magazin de 435 x 162 mm, bloc pentru reducerea urdinișului și

închizător de urdiniș. Prin construcția sa, permite combinarea mai largă a elementelor de stupi standardizate, înlesnește modelarea stupului și a volumului interior după condițiile variate ale climei și zonei de cules și face posibilă o trecere rapidă de la tipul de ramă Langstroth la Dadant și invers.

STUPUL ORIZONTAL are o încăpere paralelipipedică în care ramele sînt așezate pe un singur rînd. Părțile componente sînt : corpul, rama, podișorul, capacul, bara de fixare și echipamentul stupului (diafragma pentru reducerea cuibului și cea separatoare). Acest stup utilizează spațiul interior cu randament scăzut, necesită eforturi suplimentare pentru transport și nu permite aplicarea unor metode moderne de stupărit mai ales în unitățile apicole mari.

PAVILIONUL APICOL este o încăpere în care se adăpostesc temporar sau permanent un număr de stupi. Prezintă către exterior deschideri pentru fiecare stup, iar în interior spațiu suficient ca apicultorul să poată vizita și interveni la fiecare stup. Pavilioanele apicole sînt *fixe* și *mobile,* iar cele din urmă *autonome* și *de tip container*.

Pavilionul apicol mobil cu sistem de rulare autonom se compune din : baza cu sistem de rulare, compartimentul pentru stupi, cel de lucru și odihnă, cu dotările corespunzătoare și stupii.

Pavilionul apicol mobil de tip container este asemănător constructiv, cu deosebirea că nu are sistemul de rulare, ci suporți cu înălțimea reglabilă.

Stupul pentru pavilionul apicol trebuie să îndeplinească următoarele condiții : construcție compactă cu înălțimea cît mai mică ; spațiu suficient pentru depozitarea recoltei ; aerisire și ventilație corespunzătoare ; să permită manevrarea ușoară la intervențiile din sezonul activ și fixarea rapidă în timpul transportului.

Locul unde sînt amplasați stupii reprezintă *STUPINA, VATRA, PRISACA* sau *BĂTĂTURA*.

Pentru *înființarea stupinelor sînt necesare familii, roiuri artificiale,* pachet sau naturale. Familiile trebuie să îndeplinească următoarele condiții : să fie puternice (minimum 2 kg albine toamna și 1,5 kg primăvara), sănătoase, cu puiet mult și compact, mătci tinere, selecționate, faguri corespunzători (întregi, cu o vechime sub 3 ani, fără celule de trîntori) și cu suficiente rezerve de hrană (minimum 14 kg toamna și 8 kg primăvara). Alegerea familiilor se face după efectuarea zborului de curățire, de la o distanță de peste 6 km, pentru a preveni reintoarcerea culegătoarelor.

Mărimea stupinei este condiționată de existența și potențialul plantelor melifere de pe o rază de 3 km. În zonele cu o bogată bază meliferă se pot amplasa pe o vatră circa 100 familii, iar în cele cu resurse modeste, 25—30. S-a calculat că pentru 1 ha floara soarelui sînt necesare 1—2 familii, pentru livezi, rapiță, muștar 2—3, iar pentru coriandru 3—4. La stabilirea numărului de familii se are în vedere și faptul că, pe lîngă mierea care se extrage, albinele consumă într-un an circa 80—100 kg miere și 15—20 kg polen.

Locul unde *se amplasează* stupina trebuie să fie ferit de vînt și accesul animalelor, uscat, îngrădit cu plantații, garduri vii din plante

melifere și să prezinte o ușoară înclinație pentru scurgerea apei de ploaie. Sînt recomandate poienile din centrul pădurii și de la marginea acesteca sau livezile de pomi fructiferi. Nu pot fi folosite locurile ridicate, complet deschise, văile adînci, crestele dealurilor și munților sau versanții nordici. Este contraindicată așezarea stupinei lîngă rîuri sau ape mai mari, care reprezintă un pericol de înnec al albinelor. Trebuie evitate locurile cu mult zgomot, școli, piețe sau cele apropiate de căile ferate, șosele, centre populate, fabrici de zahăr și întreprinderi poluante ale mediului înconjurător.

Așezarea stupilor ține seama de particularitățile terenului, durata menținerii lor pe vatra respectivă și necesitatea de a evita rătăcirea albinelor. În regiunile nordice stupii se instalează pe pantele sudice sau sud-vestice, iar în cele sudice pe versanții estici sau sud-estici. La șes, se folosește *așezarea în șah*. În acest sistem, stupii sînt aliniați în rînduri cu distanța de circa 4 m între ei pe rînd și 4—5 m între rînduri. Cei din rîndul al 2-lea sînt situați în intervalul celor din rîndul întîi și așa mai departe. Pe rînduri, stupii pot sta cîte unul sau în grupuri de 2—3, la distanță de cca 1 m (fig. 120 A, B). La deal și munte, se

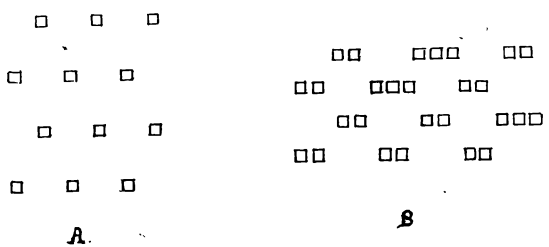


Fig. 120. A — Așezarea stupilor în șah ; B — Așezarea stupilor în șah, în grupuri de 2 și 3.

practică așezarea într-un singur rînd, la 2—3 m unul de altul sau alăturați. Stupii se fixează la înălțimea de 25—30 cm deasupra solului, cu urdinișurile spre sud, sau sud-est, iar în fața acestora se amenajează o suprafață lată de cca 0,5 m numită „oglinda stupului", pe care se presară nisip. Pentru preîntîmpinarea rătăcirii albinelor și a depopulării familiilor este indicat să se monteze în cîteva puncte ale stupinei semne de orientare (table indicatoare colorate), sau să se vopsească diferit stupii. Adăpătorul se așază în apropiere, la soare.

Fluxul tehnologic este diferit. În stupinele mici, unde albinele se cresc prioritar în stupi orizontali sau verticali cu magazii, intervențiile apicultorului sînt, în general, mai numeroase, uneori deranjînd albinele, iar tehnologiile aplicate au la bază unele soluții aplicative, mai mult sau mai puțin simple. În întreprinderile apicole mijlocii și mari,

unde se folosesc stupi multietajați și există o bună organizare a muncii, tehnologiile sînt foarte simple, dar extrem de eficiente și mecanizabile, permițînd 3—4 intervenții pe an.

COMPORTAREA CU ALBINELE. În activitatea depusă în stupină, apicultorul nu trebuie să aibă teamă de albine, deoarece aceasta determină în tegument degajarea unor secreții care irită albinele ca și nervozitatea, mișcările grăbite, lovirea stupului, strivirea albinelor, mirosurile diverse. Minuirea albinelor necesită calm, mișcări lente, atenție, îmbrăcăminte curată, dezinfectarea mîinilor. Ramele se manipulează deasupra stupului deschis, deoarece albinele tinere, care încă nu se orientează pot cădea în afară și se țin vertical, ca să nu curgă mierea. Se stă lateral față de stup, pentru a nu împiedica zborul albinelor în dreptul urdinișului. Este necesară masca pentru protecția capului, iar afumătorul se întrebuințează moderat. Vizitarea stupilor se face în zile calde, fără ploaie, vînt, arșiță, spre seară în timpul culesurilor mari, pentru a nu micșora activitatea albinelor. Cercetarea se efectuează planificat, cu un scop precis nu întîmplător, iar observațiile se notează într-un caiet special. Dacă apar înțepături mai numeroase, se amînă activitatea, se închide stupul și se îndepărtează acul împingînd lateral cu unghia (pentru a nu presa glanda cu venin în înțepătură), după care se aplică puțină soluție de amoniac, praf de cretă etc.

4.1. ÎNTREȚINEREA FAMILIILOR DE ALBINE ÎN PERIOADA DE DEZVOLTARE

Zborul de curățire reprezintă primul zbor al albinelor după iernare, cînd temperatura ajunge la 8°C și în decursul căruia elimină excrementele acumulate în rect. Durează aproximativ o oră în timpul prînzului, iar în vederea stimulării lui se deschid mai larg urdinișurile, se îndepărtează capacele și materialele de protejare termică, pentru ca soarele să încălzească podișorul și se instalează în stupină adăpătorul.

Controlul sumar de primăvară se efectuează imediat după zborul de curățire, cînd temperatura este de 12°C. Se urmărește și se notează : a) puterea familiei, după numărul intervalelor ocupate ; b) prezența mătcii, după existența puietului ; c) a hranei, prin controlul a 1—2 faguri marginali ; d) starea sanitară a cuibului.

Odată sau imediat după acest control se execută și *curățirea fundurilor stupilor* de albine moarte și rumeguș de ceară, urmată de *combaterea anomaliilor* (familii fără matcă, bezmetice, slabe, cu hrană insuficientă, bolnave, furtișagul).

Controlul general de primăvară se face la temperatura de 14—16°C, apreciindu-se : a) puterea familiei, prin numărul de intervale ocupate sau cantitatea de albine de pe fiecare fagure ; b) calitatea mătcii, prin numărul de faguri ocupați cu puiet și aspectul puietului ; c) cantitatea de miere, prin apreciere ; d) calitatea cuibului, după aspectul fagurilor ; e) aprecierea rezistenței la iernare.

Curățirea și dezinfecția stupilor urmează acestui control, spălîndu-se cu apă fierbinte cu 3—5% sodă calcinată, după care se limpezesc, se usucă și se flambează.

Hrănirea suplimentară (stimulentă) trebuie să înceapă cît mai devreme posibil, dar obligatoriu cu cel puțin 6 săptămîni înaintea culesului de salcîm (aproximativ la începutul lui aprilie) și durează 2—4 săptămîni. Se realizează prin : — descăpăcirea periodică la 2—3 zile, a unei suprafețe de 1—2 dm^2 dintr-un fagure cu miere ; — administrarea cantității de 0,3—0,5 litri sirop, în concentrație de 1 : 1 zahăr și apă ; — zahăr tos 1 kg la 2—3 săptămîni, periodic umectat cu o cantitate mică de apă ; — turte din zahăr farin și miere ; — șerbet ; — substituenți de polen în proporție de 5—20% înglobați în turte sau sirop.

Lărgirea cuibului se realizează cînd toți fagurii sînt ocupați cu puiet exceptînd cei marginali. La început lărgirea se face treptat, cu faguri mai vechi (ce conțin puțină miere, pulverizați cu sirop sau apă), care se introduc între ultimul fagure cu puiet și cel cu provizii. Mai tîrziu se pot introduce 2 faguri deodată, de o parte și alta a cuibului, iar la apariția culesului se așază faguri artificiali în centrul cuibului. La stupul orizontal, cînd familia ocupă 14—15 rame cu albine, lărgirea cuibului se face dintr-o dată ; la cel vertical cu 2 corpuri, cînd familia ocupă 10—12 faguri și are puiet pe 7—8 faguri, prin adăugare de corpuri suprapuse ; iar la cel multietajat se adaugă (și inversează) periodic corpuri.

4.2. ÎNTREȚINEREA FAMILIILOR DE ALBINE ÎN PERIOADA CULESURILOR

Se bazează pe cunoașterea particularităților biologice ale familiilor de albine și a condițiilor climatice și fenologice. Pentru stabilirea metodelor de întreținere este necesar să se cunoască : tipul de cules, adică repartizarea culesurilor în cursul sezonului, succesiunea lor și perioada de înmulțire a familiilor. Culesul poate fi „de întreținere" sau „de producție" (principal).

Lucrările de îngrijire aplicate în perioada culesului se referă la următoarele aspecte :

— *Asigurarea spațiului necesar pentru depozitarea mierii.*

În *stupii orizontali*, cu puțin timp înaintea culesului la salcîm, cuibul se organizează astfel : lîngă peretele însorit al stupului se așază un fagure cu păstură, unul artificial (pe care albinele îl vor clădi în timpul culesului, iar matca va depune ouă), apoi toți fagurii cu puiet, un al 2-lea artificial și 4—7 cu celule goale, în care se va depozita mierea. Albinele depun mierea mai întîi în celulele goale din partea superioară a fagurilor cu puiet, formînd „coroanele" de miere, apoi în cei goi. Dacă este necesar, se mai pot introduce alți faguri goi clădiți și artificiali, între ultimul fagure cu puiet și cei umpluți cu miere. Pentru ca albinele să poată circula prin ambele urdinișuri, iar matca să nu-și înceapă activitatea, se interpune o diafragmă cu gratie despărțitoare între ramele cu puiet și cele cu miere.

În *stupii multietajați* se procedează în felul următor : în corpul inferior se introduc fagurii cu puiet necăpăcit, completîndu-se dacă mai rămîne spațiu, cu faguri cu puiet căpăcit ; în corpul al 2-lea se așază restul de faguri cu puiet căpăcit și alții cu celule goale ; corpul

al 3-lea și eventual al 4-lea se aplică numai dacă este absolută nevoie. Pentru limitarea activității mătcii, se poate utiliza gratia despărțitoare intercalată între corpul inferior și al 2-lea.

În *stupii RA 1001*, se așază deasupra cuibului magazinul pentru miere. Albinele depozitează mierea mai întîi în partea superioară a fagurilor cu puiet formînd „coroanele" de miere, apoi în fagurii din magazin. Cînd acesta este pe jumătate plin cu miere, se așază al 2-lea magazin cu faguri goi, între corpul stupului și primul.

În *stupii verticali cu două corpuri*, se restructurează cuibul : fagurii cu puiet necăpăcit și păstură se trec în corpul inferior, iar dacă mai rămîne spațiu se așază și faguri cu puiet căpăcit. Corpul superior conține restul fagurilor cu puiet căpăcit și alții cu celule goale. În aceștia din urmă și în cei eliberați treptat prin eclozionarea albinelor adulte este depozitată. mierea. Gratia despărțitoare se găsește deasupra corpului inferior.

— *Aplicarea metodei de întreținere a familiilor de bază cu familii ajutătoare*, dă posibilitatea realizării unei suprapopulări cu albine culegătoare. *Procedeele* de formare a familiilor ajutătoare : se iau din familia de bază 4—6 faguri acoperiți de albine, din care 2—3 cu puiet căpăcit. Se așază într-un compartiment de la un capăt al stupului orizontal sau într-un corp gol situat deasupra familiei de bază la stupul multietajat, separat de aceasta prin podișorul Snellgrove (cu plasă de sîrmă la mijloc și 6 urdinișuri pe laturi). Fiecare familie nouă va avea urdinis propriu, cîte o matcă împerecheată, îngrijirile obișnuite și cel puțin cîte 1,2—1,5 kg albine. Aproximativ între 15—25 septembrie se va unifica familiile ajutătoare cu cele de bază, prin înlăturarea diafragmei și a podișorului. În al 2-lea an se vor realiza din nou familii ajutătoare, prin formarea timpurie, în perioada dezvoltării maxime a familiilor de bază și tardivă, după culesul de vară. Ajutorarea familiilor de bază se realizează prin unirea efectivă pe timpul culesului principal a celor 2 familii și aducerea de albine culegătoare și faguri cu puiet din familia ajutătoare.

— *Menținerea familiilor de albine în stare activă*, necesită următoarele *măsuri preventive* : — lărgirea la timp a cuibului la stupii orizontali, prin introducerea simultană a cîtorva faguri, asigurîndu-se spațiu suficient, densitate normală a albinelor, temperatura optimă, iar la cei multietajați, prin reluarea inversării periodice a corpurilor și așezarea la timp a celor suplimentare ; — ridicarea periodică a fagurilor cu puiet căpăcit și folosirea lui la întărirea familiilor mediocre și slabe, formarea familiilor noi, nuclee cu mătci de rezervă sau familii ajutătoare ; înlocuirea mătcilor uzate cu altele prolifice, obținîndu-se o cantitate mare de puiet ; — însămînțarea de plante melifere și stupărit pastoral, pentru asigurarea unei activități permanente a albinelor ; — creșterea dirijată și selecție, eliminînd de la înmulțire familiile cu înclinație spre roire ; — întreținerea familiilor în stupi de volum mare, adăugînd la timp corpuri suplimentare ; — asigurarea unei ventilații intense, prin deschiderea completă a urdinișurilor și aplicarea podișorului cu plasă.

STUPĂRITUL PASTORAL constă în deplasarea familiilor de albine la masive de plante melifere și are drept scop valorificarea cît mai multor culesuri în cadrul sezonului apicol. Acesta necesită o serie de *lucrări pregătitoare:* planificarea termenelor, a mijloacelor de transport adecvate, forța de muncă, inventarul necesar, alegerea locului, stabilirea itinerarului și a drumurilor de acces, identificarea resurselor melifere, informații asupra bolilor din zonă, obținerea repartiției și a certificatului sanitar etc. Cu cîteva zile înainte se execută o revizie generală, cînd se înlocuiesc fagurii artificiali, proaspăt construiți, cei cu multă miere (lăsînd o rezervă de 6 kg miere familie), se completează spațiul liber cu rame goale, se atașază magazii sau corpuri pentru depozitarea mierii și se repară defectele. Se asigură permanent ventilația, fără a îngădui ieșirea albinelor din stupi și se închid urdinișurile la încetarea activității de zbor. *Transportul* se efectuează cu: — autocamionul, în care stupii se încarcă pe 2—3 rînduri, cu ramele perpendiculare pe direcția de înaintare; — tracțiune animală, asigurîndu-se un strat gros de paie sau crengi sub și între stupi; — platforme speciale, simple, cu capacitatea de 6—20 stupi; — tractoare rutiere cu 1—2 remorci; — pe calea ferată, așezînd stupii pe un rînd, avînd ramele paralele cu parcursul; — pe apă, asigurînd umbrirea lor etc. Acesta are loc primăvara de preferință ziua, iar în perioadele calde noaptea. La destinație, se descarcă stupii. se așază pe vatră, se deschid urdinișurile, se instalează adăpătorul, iar după încetarea zborului de recunoaștere și liniștirea albinelor se așază podișoarele. În zilele următoare se efectuează despachetarea și organizarea cuiburilor, luîndu-se măsuri de prevenirea rătăcirii și depopulării.

4.3. ÎNTREȚINEREA FAMILIILOR DE ALBINE ÎN VEDEREA IERNĂRII ȘI IERNAREA LOR

După ultimul cules principal și recoltarea mierii se face un *control general.* — Se restrîng cuiburile în raport cu populația de albine din fiecare familie, se scot fagurii necorespunzători și cei prea noi (de culoare foarte deschisă).

— Se iau o serie de *măsuri pentru obținerea unor familii puternice la intrarea în iarnă,* constituite din generații tinere, de la sfîrșitul verii și începutul toamnei. Aceasta se realizează prin: — înlocuirea mătcilor vîrstnice și necorespunzătoare, cu altele provenite din familiile cele mai productive, rezistente la boli și iernare; — asigurarea unui spațiu corespunzător pentru ca matca să depună ouă; — hrănirea stimulentă de toamnă cu miere, sirop de zahăr, sirop amestecat cu drojdie de bere inactivată în proporție de 5%, zahăr tos și care se oprește cu aproximativ 3 săptămîni înainte de încetinirea zborului albinelor.

— *Se asigură provizii de hrană pentru perioada iernării:* o familie de putere medie, de la intrarea în iarnă pînă la apariția culesului are nevoie de 18—20 kg miere și 3—4 faguri cu păstură. În producție se utilizează două procedee de asigurare a hranei: — prin reținerea întregii cantități de miere de la culesurile principale; — prin asigurarea necesarului de miere în proporție de 50%, efectuîndu-se hrănirea de completare cu sirop de zahăr, pe care albinele îl transformă în miere.

Organizarea cuibului și *aranjarea proviziilor de hrană* urmăresc dimensionarea cuibului în raport cu puterea fiecărei familii și repartizarea proviziilor de hrană în așa fel, încît albinele din ghemul de iernare să aibă acces la ele, fără a se deplasa pe alți faguri.

În stupii orizontali și RA 1001 se practică *organizarea centrală, bilaterală* și *unilaterală* a proviziilor de hrană. În primul caz, fagurii cu cea mai mare cantitate de miere se așază în centrul cuibului, iar lateral, în ordine descrescîndă, cei cu una mai mică, fără a se lăsa faguri cu mai puțin de 0,5 kg. În al 2-lea caz, fagurii cu cea mai multă miere se situează pe părțile laterale, urmînd către centru, în ordine descrescîndă, cei cu miere mai puțină, dar nu sub 1,5 kg. În ultimul caz, fagurii sînt dispuși în ordine crescîndă, după mierea conținută, către unul din pereții stupului, primul dinspre urdiniș avînd cantitatea cea mai mică, dar nu sub 1,5 kg.

La stupii multictajați, în corpul superior, 3—4 faguri cu cea mai multă miere se așază lateral, iar 6—7 cu cîte 1,5—2 kg în centru; cel puțin 3 faguri centrali trebuie să conțină și păstură. În corpul inferior, se așază lateral fagurii cu restul de miere, iar către centru cei cu păstură și celule goale.

— *Se asigură un regim termic corespunzător.* Familiile de albine normale și cu provizii abundente de hrană iernează în aer liber, pe locul lor din stupină, protejîndu-le numai în interior cu perne confecționate din pînză de sac umplute cu paie sau saltele din paie presate. Împotriva vînturilor și a curenților reci se folosesc paravane de protecție din nuiele, coceni de porumb, tulpini de floarea soarelui sau stuf, garduri mobile de șipci etc. Un alt procedeu de iernare este în cojoc individual sau colectiv (pentru 25—50 stupi). Se construiește un suport din grinzi sau baloți de paie, la 20—30 cm deasupra solului, pe care se așază stupii pe un rînd sau două (cu urdinișurile opuse). În primul caz cojocul este orientat cu spatele spre vîntul dominant, iar în al doilea perpendicular pe acesta. Între stupi, rînduri și deasupra lor se așază paie, coceni, frunze uscate și totul se acoperă cu carton asfaltat pentru a împiedica pătrunderea apei.

În timpul iernii se recomandă o *ventilație* nu prea intensă, care se realizează prin micșorarea urdinișurilor la 2—3 cm. *Zgomotul* sau *trepidațiile* în apropierea stupilor tulbură familia, iar unele albine se desprind din ghem și pier. Agitația poate fi cauzată de lipsa mătcii, a ventilației sau pătrunderea șoarecilor, la care reacționează prin consum mai mare de hrană, care duce la supraaglomerarea tubului digestiv și îmbolnăvirea de diaree.

— *Îngrijirea albinelor în timpul iernii* se reduce la controlul periodic, fără deschiderea stupului. Se execută un *control auditiv* lipind urechea de peretele din față al stupului, cu stetoscopul sau un tub de cauciuc. Un zumzet uniform indică iernarea normală; unul slab, asemănător foșnetului de frunze uscate — lipsa de hrană; altul prelung, neuniform, plîngător — lipsa mătcii. Cînd nu se percepe nici un zgomot, se lovește ușor în peretele stupului: dacă se aude un zgomot scurt, puternic, care se stinge imediat, denotă că familia este în stare normală; dacă nu se aude nimic, chiar la repetarea loviturii înseamnă că familia a pierit.

Acest control se face lunar în prima jumătate a iernii numai la familiile slabe și cele cu provizii de miere la limită și la interval de 10 zile sau săptămînal, în a 2-a jumătate, la toate familiile. Se *examinează resturile* de pe fundul stupului (extrase cu un cîrlig obișnuit înfășurat în tifon sau vată pentru a nu produce zgomot), obținîndu-se relații despre : amploarea mortalității (cauzată de vîrstă sau boală), umezeala ridicată (albine mucegăite), pătrunderea rozătoarelor (exemplare fără cap, bucăți de fagure, excremente), hrană necorespunzătoare, nosemoză (albine cu abdomen voluminos), cristalizarea mierii (cristale printre resturi).

— *Stările anormale* cele mai frecvente iarna și care trebuie *remediate* sînt : lipsa hranei, pierderea mătcii, pătrunderea șoarecilor, îmbolnăvirea de diaree.

CREȘTEREA MĂTCILOR se face pe cale naturală și artificială.

Creșterea naturală reprezintă o însușire a coloniei de albine, de a crește mătci din larve tinere de lucrătoare, cînd au pierdut matca sau aceasta nu mai este corespunzătoare, clădind singure „botci de salvare" și cînd familia se pregătește de roit, formînd „botci de roire". Datorită faptului că acest sistem de creștere are o serie de dezavantaje, în toate unitățile specializate se practică o creștere dirijată a mătcilor.

Creșterea artificială asigură numărul necesar de mătci la timpul dorit, din cele mai valoroase familii, ușurează munca de selecție, mînuirea materialului biologic, obținerea mătcilor de calitate. Pentru reușita acestei creșteri trebuie efectuate o serie de *LUCRĂRI PREGĂTITOARE* ca :

A) *Planificarea activității de creștere a mătcilor*, măsură organizatorică, ale cărei *obiective* mai importante sînt : stabilirea necesarului de botci artificiale, calcularea numărului de rame de creștere, numărul de nuclee destinat împerecherii mătcilor, necesarul de familii pentru popularea cu albine a nucleelor, familii furnizoare de larve destinate transvazării, familii de adoptare și pentru creșterea larvelor.

B) *Stabilirea perioadei de creștere a mătcilor*. Data optimă coincide cu declanșarea roirii naturale. În unitățile specializate, creșterea începe odată cu înflorirea pomilor fructiferi și durează în tot sezonul activ, cu condiția existenței unui cules de întreținere sau a hrănirilor stimulente, iar în cele nespecializate, după culesul de salcim în zonele sudice ale țării și în perioada culesului de fînețe în rest.

În *LUCRĂRILE DE CREȘTERE* a mătcilor se folosesc 2 metode :

1) *Creșterea mătcilor fără transvazarea larvelor :* se ridică din familia donatoare, fagurele cu larve tinere de 12—36 ore, după îndepărtarea albinelor cu ajutorul periei apicole. Se transportă cu caseta pentru rame în laborator, se așază pe masă, se taie în fîșii de cîte un rînd de celule, se scurtează la jumătate pereții acestora, apoi se decupează în celule independente. Se fixează cîte 15 celule pe șipcile de creștere, prin intermediul suporturilor de botci, apoi pereții celulelor se răsfrîng cu șablonul dilatator, iar ramele se introduc în familiile de acceptare sau direct în cele de creștere orfanizate. În cazul creșterii mătcilor în prezența celei a familiei crescătoare, este necesară în prealabil, creșterea larvelor de către familiile de acceptare sau startere, puternice, din care se îndepărtează matca, ramele cu puiet necăpăcit și surplusul de faguri

goi și cu rezerve de hrană. După 6 ore de la orfanizare se introduc ramele de creștere și se dă sirop de zahăr. După 24 ore larvele sînt acceptate (primesc lăptișor de la doici), apoi se cresc în familii crescătoare în prezența mătcii pentru prevenirea depopulării acestora. Cînd nu se folosesc familii de adoptare, ramele de creștere se introduc direct în cele crescătoare, tot după 6 ore de la orfanizarea acestora. După 9 zile, botcile căpăcite, detașate împreună cu suporturile lor se trec în colivii de eclozionare tip Zander, așezate pe ramele de susținere. Rama cu coliviile se mută după ultima cu puiet sau se introduce într-un termostat. După eclozionare se face o preselecție, înlăturîndu-se mătcile cu anomalii.

2) *Creșterea mătcilor prin transvazarea larvelor* presupune mutarea lor din celulele unui fagure natural în botci artificiale. Se scot din familiile furnizoare rame cu larve tinere de 12—36 ore, scurtîndu-se cu un cuțit încălzit circa 2/3 din înălțimea celulelor. Se izolează matca pe un fagure situat între 2 faguri cu puiet foarte tînăr, care vor atrage numeroase albine doici și se introduce un fagure cu miere și păstură spre peretele stupului. În ziua a 4-a apar larve apte pentru transvazare. Aceasta se execută introducînd lanțeta (spatula) pe sub larvă, prin partea dorsală, astfel ca cele 2 extremități să rămînă libere, iar depunerea în botci se realizează atingînd extremitățile larvei de fundul botcii și retrăgînd spatula. Transvazarea poate fi *uscată*, așezîndu-se larva direct în botca artificială sau *umedă*, pe lăptișor introdus anterior în aceasta.

După transvazare, ramele cu botci artificiale se introduc în familiile de acceptare, unde se țin 24 ore, apoi în cele crescătoare 9 zile, după care botcile căpăcite se așază în coliviile de eclozionare. Se formează nuclee de împerechere, familii mici, în care mătcile *se împerechează* în 15 zile de la introducere și încep depunerea ouălor pe 1—2 faguri.

Acceptarea noilor mătci în familiile de albine se face în funcție de: anotimp, starea familiei, condițiile de cules, calitatea mătcii. S-a observat că matca nouă este primită foarte ușor dacă albinele nu sînt deranjate cu 3—4 zile înainte și dacă este așezată într-o colivie în care a stat în prealabil 12—14 ore matca veche. Introducerea mătcilor se efectuează sub formă de botcă, matcă liberă sau în colivii (cuști) tip Miller; Titov, Benton, capac.

CREȘTEREA TRÎNTORILOR: se aleg familii în care se introduc la începutul lunii aprilie, 1—2 faguri cu celule de trîntori, unde matca va depune ouă, ce vor asigura în mai, trîntori maturi necesari împerecherii. Pentru îngrijirea larvelor, se recomandă ca fagurii cu puiet, în momentul eclozionării să fie trecuți în familii doici, puternice, cu populație masivă de albină tînără. Pentru asigurarea stupinei numai cu trîntori doriți, trebuie împiedicată apariția altora din celelalte familii. Împerecherea cu trîntori în procente foarte ridicate, chiar 100%, necesită avansarea creșterii reproducătorilor cu 10—14 zile față de creșterile normale. Ea se poate efectua și în puncte de împerechere controlată, izolate, neexistînd posibilități de pătrundere a trîntorilor străini pe o rază de 12—15 km. Mătcile împerecheate aici se recoltează după 15 zile, introducîndu-se în locul lor altă serie de nuclee cu mătci pentru împerechere.

4.4. ÎNMULȚIREA FAMILIILOR DE ALBINE

Se realizează prin *roire.*

— *Înmulțirea (roirea) naturală* se manifestă instinctual la toate familiile de albine. În mod normal, roiesc numai familiile sănătoase, puternice și cu provizii bogate de hrană, asigurînd o descendență viguroasă. În condițiile țării noastre, aceasta se produce în luna iunie, cu toate că sînt și roiuri la începutul lui mai sau în august și necesită supravegherea pregătirii familiilor pentru roit, a roitului, instalării roiurilor și îngrijirii acestora. Această înmulțire prezintă o serie de *avantaje:* — se obține o familie nouă sau chiar mai multe, fără nici o intervenție din partea apicultorului; — familiile noi instalate pe faguri artificiali în stupi noi sau dezinfectați sînt sănătoase și se vor menține așa și în anul viitor. *Dezavantajele* sînt: — imposibilitatea planificării numărului și calității roiurilor; — supravegherea permanentă a stupinei, neștiindu-se exact cînd și din care stupi va ieși roiul ce trebuie prins; — roirea unor familii nedorite, necorespunzătoare ca producție de miere.

— *Înmulțirea (roirea) artificială* oferă posibilitatea obținerii unor familii în număr dorit și în perioade potrivite, din altele cu însușiri biologice și productive superioare, putîndu-se aplica selecția. Ea se efectuează prin următoarele *metode:* stolonare, divizare (simplă), intensivă, mutare simplă, metoda familiilor de bază perechi (a roiului culegător), evantai, a nucleelor, roiului pachet, timpurii, cu mătci iernate în afara ghemului. Roiurile artificiale trebuie instalate la cel puțin 2 km depărtare de vatra de bază. În cazul așezării pe aceeași vatră se dă roiului, la formare, mai multe albine tinere, pentru a suplini depopularea.

AMELIORAREA ALBINELOR sau acțiunea de îmbunătățire a însușirilor productive ale unei familii de albine se desfășoară pe 3 căi: selecția în interiorul rasei sau populației, consangvinizarea și încrucișarea între rase, populații sau linii consangvine (hibridare).

Însușirile urmărite privind selecția se grupează în 2 categorii:

— *principale:* producția de miere, ceară, prolificitatea mătcii, rezistența la iernare și boli, modul de depozitare a mierii, predispoziția la roire;

— *secundare:* modul de căpăcire a mierii, calitatea albinelor (hărnicia, longevitatea, irascibilitatea sau blîndețea, modul de comportare pe faguri, clădirea fagurilor, amplasarea rezervelor de hrană).

Metodele folosite sînt: selecția în masă, individuală și pe bază de linii.

4.5. RESURSELE MELIFERE

Sînt reprezentate prin numeroase specii, grupate în următoarele categorii de plante: — forestiere (arbori și arbuști meliferi); — agricole cultivate (tehnice, furajere, legumicole, medicinale și aromatice, tipice, pomi fructiferi, viță de vie); — erbacee spontane (din păduri, fînețe și pășuni).

4.5.1. PLANTELE MELIFERE FORESTIERE

Arbori și arbuști

Robinia pseudacacia (salcîmul alb), *R. decaisneana* (salcîmul roz), *R. viscoza* (salcîmul roșu), *Amorpha fruticosa* (salcîmul pitic sau amorfa), *Cytisus laburnum* (salcîmul galben), *Tilia tomentosa* (teiul alb sau argintiu), *T. cordata* (teiul roșu sau cu frunza mică), *T. platiphyllos* (teiul cu frunza mare sau flutureșc), *Acer tataricum* (arțarul tătărăsc), *A. campestre* (jugastrul), *A. platanoides* (paltinul de cîmp), *A. pseudoplatanus* (paltinul de munte), *Ailanthus altissima* (cenușerul sau oțetarul fals), *Sophora japonica* (salcîmul japonez), *Aesculus hippocastanum* (castanul), *Gleditschia triacanthos* (glădița), *Koelreuteria paniculata* (clocotișul sau oțetarul galben), *Salix caprea* (salcia căprească), *S. alba* (salcia albă), *S. cinerea* (zălogul), *S. viminalis* (răchita), *S. purpurea* (răchita roșie), *S. incana* (răchita albă), *Picea excelsa* (molidul), *Alnus glutinosa* (aninul), *Corylus avellana* (alunul), *Cornus mas* (cornul), *Crataegus oxyacantha* (păducelul), *Sambucus nigra* (socul), *Prunus spinosa* (porumbarul), *Rhamnus frangula* (crușinul), *Viburnum opulus* (călinul), *Ligustrum vulgare* (lemnul cîinesc), *Berberis vulgaris* (dracila), *Rubus idaeus* (zmeurul), *R. caesius* (murul), *Calluna vulgaris* (iarba neagră).

4.5.2. PLANTELE MELIFERE AGRICOLE CULTIVATE

Plante tehnice

Brassica napus oleifera (rapița de toamnă), *B. n. f. annua* (rapița de primăvară), *Brassica alba* (muștarul alb), *B. nigra* (muștarul negru), *Coriandrum sativum* (coriandrul), *Helianthus annuus* (floarea soarelui), *Zea mays* (porumbul), *Sorgum sp.* (sorgul sau mături), *S. halepense* (iarba de Sudan), *Beta vulgaris* (sfecla de zahăr), *Gossypium hirsutum* (bumbacul), *Nicotiana tabacum* (tutunul), *Fagopyrum esculentum* (hrișca), *Carthamus tinctorius* (șofrănași), *Cichorium endivia* (cicoarea de grădină).

Plante furajere

Medicago sativa (lucerna), *M. falcata* (lucerna galbenă), *Lotus corniculatus* (ghizdeiul), *Vicia sativa* (măzărichea de primăvară), *V. villosa* (măzărichea de toamnă), *V. faba* (bobul), *V. pannonica* (borceagul), *Trifolium pratense* (trifoiul roșu), *T. repens* (trifoiul alb), *T. hybridum* (trifoiul hibrid), *Melilotus albus* (sulfina albă), *M. officinalis* (sulfina galbenă), *Onobrychis sativa* (sparceta).

Plante legumicole

Raphanus sativus (ridichea-semincer), *Brassica oleracea var. capitata* (varza pentru sămînță), *B. o. var. cotrytis* (conopida pentru sămînță), *B. o. var. gongylodes* (gulia pentru sămînță), *Allium cepa* (ceapa-semincer), *Daucus carota* (morcovul — semincer), *Apium graveolenus* (țelina), *Petroselinum sativum* (pătrunjelul), *Levisticum officinale* (leușteanul), *Anethum graveolens* (mărarul), *Pastinaca sativa* (păstîrnacul), *Cucurbita maxima* (dovleacul), *C. pepo* (dovlecelul), *Colocynthis citrullus* (pepenele verde), *Cucumis melo* (pepenele galben), *C. sativus* (castravetele), *Spinacea oleracea* (spanacul).

Plante medicinale și aromatice

Carum carvi (chimenul), *Thymus vulgaris* (cimbrul), *Mentha piperita* (izma bună), *Lavandula angustifolia* (levănțica), *Hyssopus officinalis* (isopul), *Salvia officinalis* (șalvia sau jaleșul de grădină), *Pimpinella anisum* (anasonul), *Foeniculum officinale* (feniculul), *Papaver somniferum* (macul de grădină), *Majorana hortensis* (măgheran), *Cynara scolymus* (anghinarea), *Melissa officinalis* (roinița, iarba stupului), *Althaea rosea* (nalba de grădină).

Plante melifere tipice

Phacelia tanacetifolia (facelia), *Dracocephalum moldavica* (mătăciunea).

Pomi fructiferi și vița de vie

Armeniaca vulgaris (caisul), *Persica vulgaris* (piersicul), *Cerasus avium* (cireșul), *C. vulgaris* (vișinul), *Prunus domestica* (prunul), *Pirus sativa* (părul), *Malus silvestris var. domestica* (mărul), *Cydonia oblonga* (gutuiul), *Juglans regia* (nucul), *Vitis vinifera* (vița de vie).

1.5.3. PLANTELE MELIFERE ERBACEE SPONTANE DIN PĂDURI, FINEȚE ȘI PAȘUNI

Galanthus nivalis (ghiocelul), *Scila bifolia* (vioreaua), *Corydalis cava* (brebenelul), *Viola odorata* (toporașul), *Hepatica nobilis* (floarea paștelui), *Ornithogalum umbellatum* (ceapa ciorii), *Lamium purpureum* (urzica moartă), *Pulmonaria officinalis* (mierea ursului), *Allium ursinum* (leurda), *Chamaenerion angustifolium* (sburătoarea), *Taraxacum officinale* (păpădia), *Crocus moesiacus* (brândușa galbenă sau de primăvară), *Gagea lutea* (laptele păsării), *Tussilago farfara* (podbalul), *Primula officinalis* (ciubotica cucului), *Brassica rapa var. silvestris* (rapița sălbatică), *Papaver rhoeas* și *P. dubium* (macul de cîmp), *Delphinium consolida* (nemțișorul de cîmp), *Salvia nemorosa* (jaleșul de cîmp), *S. pratensis* (salvia de cîmp), *S. verticillata* (urechea porcului), *Thymus serphyllum* (cimbrișorul), *Leonorus cardiaca* (talpa gîștii), *Echium vulgare* (iarba șarpelui), *Borago officinalis* (limba mielului), *Stachys annua* (busuiocul de miriște), *Cirsium arvense* (pălămida), *Marrubium vulgare* (ungurașul, voronițucul), *Malva silvestris* (nalba), *Verbascum sp.* (lumînărica), *Atriplex tatarica* (loboda sălbatică), *Cichorium inthybus* (cicoarea), *Epilobium hirsutum* (pufulița), *Oenanthe aquatica* (mărărașul sau butoiașul), *Lythrum intermedium, L. salicaria* (răchitanul), *Trifolium fragiferum* (trifoiul roșu sau căpșunica), *Mentha aquatica* (izma broaștei), *Lycopus europeus* (urzica de baltă).

4.6. PRODUSE APICOLE

Produsele apicole sînt: mierea, ceara, lăptișorul de matcă, veninul, propolisul, polenul, păstura.

MIEREA este produsul de bază, rezultat din nectarul florilor și secrețiile dulci de pe plante, prelucrat și depozitat în faguri de către albine. Ea se clasifică astfel: — după originea materiei prime, în *florală (mono* și *polifloră)* și *extraflorală (de pădure)*; — după modul de pre-

zentare, în *extrasă din faguri* (fluidă și cristalizată) și *în faguri;* — după calitate, în *superioară, calitatea I* și *a II-a.* Delimitarea pe calități se face pe baza proprietăților fizice (culoare, aromă, gust, consistență, higroscopicitate, greutate specifică, impurități) și a compoziției chimice. Mierea constituie un valoros aliment energetic; 1 kg miere produce 3280 de calorii mari. Este 1½ ori mai hrănitoare decît carnea, de 3 ori decît cartofii și de 5 ori decît strugurii sau laptele. Se întrebuințează în terapia bolilor tubului digestiv, în afecțiunile pulmonare, cardiace, nervoase, etc.

Recoltarea și extracția mierii se efectuează frecvent după fiecare cules principal (salcîm, floarea soarelui, tei etc.). *Deschiderea stupului* și *intervenția* în cuibul familiei de albine trebuie în așa fel făcute, încît să le sustragă cît mai puțin posibil de la activitatea lor obișnuită. În *manipularea ramelor* să se efectueze lucrările cu mișcări sigure, calme, evitînd strivirea albinelor, iar afumătorul să se minuiască atent, protejîndu-se fagurii de funingine. Alegerea ramelor din stupi se face după ce fagurii au fost umpluți cu miere, iar albinele au început căpăcirea celulelor în partea superioară a acestora. Se recomandă ca la recoltarea mierii să se țină o evidență strictă pentru fiecare familie (se cîntăresc ramele înainte și după extracție). Scoaterea ramelor se face după o prealabilă afumare și îndepărtare a albinelor de pe suprafața lor. În cazul unui număr redus de familii, rămîne actuală metoda scuturării și perierii albinelor de pe faguri cu peria apicolă. În stupinele de tip industrial se preconizează folosirea unor substanțe insectifuge (acid fenic 50—70% sau anhidridă propionică), avîndu-se grijă ca acestea să nu picure pe faguri.

Extracția mierii se execută într-o cameră special amenajată, curată, luminoasă, ferită de accesul albinelor și în care temperatura să fie de 25—35°C (se admite minimum 18°C). Utilajul apicol se spală cu apă fierbinte, în care s-a pus sodă 5%, apoi se limpezește de cîteva ori cu apă curată și se expune la soare 1—2 ore. Lucrările de extracție constă în: sortarea după greutate și culoare, descăpăcirea și introducerea în extractor. Descăpăcirea se realizează folosindu-se masa sau tava și cuțitul pentru descăpăcit. Fagurii descăpăciți pe ambele fețe se așază pe stativul existent deasupra mesei, în vederea realizării seriilor. La fiecare serie se introduce în extractor un singur tip de rame, ce conțin, pe cît posibil, cantități aproximativ egale de miere. La început, manivela se învîrtește încet și se face extragerea incompletă a mierii dintr-o față a fagurilor (extractor tangențial) pînă ce se percepe fosnetul caracteristic proiectării mierii pe pereții vasului, după care fagurii se întorc cu cealaltă față spre exteriorul extractorului (manual sau automat) și se continuă extracția pînă la golirea lor completă. După centrifugare, fagurii se depozitează în corpuri și se introduc în stupi. În stupinele de tip industrial, fagurii cu miere sînt transportați la stația centrală pentru extracția mierii.

Condiționarea mierii se face prin: — *prefiltrare* printr-o strecurătoare dublă așezată la robinetul de scurgere al extractorului, deasupra vasului în care se scurge mierea; — *limpezire* în maturatoare, unde are loc și stratificarea; — *lichefiere* și *cupajare* pentru obținerea culorii, aromei și gustului urmărit prin amestecul mai multor sorturi; — *pas-*

teurizare la temperaturi de 70—80°C, timp de 5 minute și răcire la 25°C. Urmează *ambalarea* în vase de sticlă, lemn sau aluminiu.

CEARA secretată de glandele ceriere ale albinelor servește la construirea fagurilor, precum și în industriile : farmaceutică, electronică, optică, tăbăcărie, aviație etc. După materia primă și tehnologia extragerii, se deosebesc 3 categorii de ceară : *de stupină* (din căpăcele, făgurașii ramelor clădităre și fagurii reformați), *de boștină* (din deșeurile rămase la extragerea cerii în stupină) și cea *extrasă din solvenți* (din deșeuri de faguri și boștină). Ceara (topită) din punct de vedere calitativ se clasifică în : — *superioară* (albă, uniformă în toată masa ei) : — *calitatea I* (albă-gălbuie, uniformă în toată masa, fără corpuri străine la partea inferioară a blocului, cu miros plăcut) ; — *calitatea a II-a* (galbenă pînă la brună deschis, uniformă cel puțin în jumătatea superioară a blocului) ; — *calitatea a III-a* (galbenă-portocalie cu reflexe roșietice, neagră cu reflexe cenușii și miros de paie opărite sau mucegăite). Proprietățile fizice (culoarea, mirosul, greutatea specifică, punctul de topire, coeficientul de duritate), corelate cu compoziția chimică oferă indici pentru utilizare și asupra metodelor de topire și separare folosite.

Extragerea cerii de stupină se realizează prin mai multe procedee, în funcție de agentul de încălzire, folosind : topitorul solar, sau cu abur, apa încălzită, prese și mai rar centrifuga. Fagurii vechi care urmează să fie topiți, în prealabil se sortează astfel : — *calitatea I* (cei de culoare albă și galbenă, transparenți, fără păstură, molii și mucegai) ; — *calitatea a II-a* (bruni închis, cu fundul celulelor transparent, fără păstură) : — *calitatea a III-a* (bruni închis și negri, netransparenți și nemucegăiți) ; ceilalți intră în categoria *„ceară inferioară"*. Calupurile de ceară *se condiționează* prin limpezire, spălare și topire repetată în apă (distilată), de ploaie, la o temperatură pînă la 90°C. Răcirea trebuie să se realizeze cît mai lent (2—3 zile). Calupul obținut se curăță la partea inferioară de sedimente, se sparge și se retopește, pentru purificare.

LAPTIȘORUL DE MATCĂ este produsul secretat de glandele faringiene ale albinelor tinere (doici), folosit în hrănirea larvelor și a mătcilor. Se prezintă sub forma unei mase dense, cu gust astringent, miros puțin aromat, aspect albicios-opalescent și care în contact cu acrul, la temperatura de 15°C se îngălbenește. Conține în proporții armonioase, elemente de mare valoare alimentară și tonică. Acționează ca stimulent puternic și multilateral al funcțiilor organismului uman. Pentru *producerea* lui pînă la o anumită fază tehnologică, toate operațiile se bazează pe criteriile clasice ale creșterii mătcilor, adică prin orfanizare sau în prezența mătcii, cu botci artificiale. În acestea se introduc larve cu o spatulă din sîrmă oțelită avînd vîrful subțire și îndoit într-un unghi de 100°. Așezarea larvei se face introducînd spatula pînă ce atinge fundul botcii, după care aceasta este ușor apăsată, înclinată și deplasată lateral Larva rămîne în botcă datorită aderenței la lăptișorul de matcă cu care aceasta a fost amorsată. Botcile cu larve se așază cu gura în jos pe o pînză flanelată umezită cu apă caldă, apoi pe rama port-botci. Aceasta se duce la stupul pregătit în prealabil, învelită într-un prosop pentru

a o feri de curenții de aer și soare. Cînd botcile conțin cantitatea maximă de lăptișor, se recoltează (după 72 ore). Pentru aceasta, se scurtează botcile pînă aproape de suprafața lăptișorului, folosind un cuțit cu lamă subțire de alamă, încălzit. Se scot larvele din ele, fie prin dispozitivul de absorbție al aparatului de recoltat, fie cu o spatulă din lemn sau material plastic, subțire la vîrf ca o scobitoare. Urmează *recoltarea* (extragerea din botci) propriu-zisă a lăptișorului, cu pompe de vid ori o spatulă din lemn de tei sau material plastic, avînd un vîrf lat de cca 4 mm, rotunjit și altul ascuțit. *Depozitarea temporară* se face în recipiente mici (borcane) de sticlă neutră și culoare închisă sau din material plastic mat, cu capac (nu din metal). În continuare, are loc *filtrarea* prin sită de mătase sau pînză din fir fin de material plastic, apoi *conservarea* în borcane de 100—150 g și culoare închisă, cu închidere ermetică, clătite în prealabil cu alcool pur. Se păstrează la 0—4°C, în loc uscat și întunecos.

VENINUL este un lichid transparent, cu miros fin, gust amar și care cristalizează în contact cu aerul. Se poate obține fără sacrificarea albinelor, prin anestezie temporală cu eter sulfuric sau șoc electric. Se întrebuințează în tratamentul reumatismului, sciaticei, nevriților, al unor boli de piele, gușei exoftalmice ș.a. La persoane mai vîrstnice acționează asupra permeabilității capilarelor, metabolismului, capacității de muncă.

PROPOLISUL este alcătuit din rășini, balsamuri, uleiuri eterice și aromate, ceară, polen. Are culoare variabilă, miros plăcut, pătrunzător și proprietăți bactericide, cicatrizante, antibiotice, antiseptice, imunologice, terapeutice. Albinele îl folosesc la astuparea crăpăturilor stupului, lustruirea celulelor, și acoperirea unor dăunători omorîți.

POLENUL recoltat de albine se obține cu ajutorul *colectoarelor* atașate la urdiniș, prevăzute cu orificii avînd diametrul de 4,5 mm, prin care trec albinele și cedează 15—20% din polenul adunat în coșulețe. Acesta se acumulează în sertarul colectorului, de unde se recoltează zilnic. *Uscarea* se efectuează cu diferite tipuri de uscătoare : acționate cu apă caldă, electrice sau industriale. *Depozitarea* în vederea *conservării* se face în dulapuri sau depozite frigorifice, cu temperatură constantă între +4 și +5°C. Cantități mici de polen se pot conserva prin îmbuteliere în vase speciale, din care se scoate aerul și se introduce CO_2, care nu permite dezvoltarea paraziților sau mai ales pentru uz casnic, prin amestecare cu zahăr. Polenul este utilizat în hrana albinelor, întreținerea sănătății omului și tratamentul diferitelor afecțiuni. El nu este un medicament, ci în primul rînd un valoros aliment dietetic.

PĂSTURA este alcătuită din polen amestecat cu urme de miere și cu diastaze care îl fac să sufere un început de fermentare. Pentru depozitarea ei albinele preferă fagurii vechi, înnegriți, așezați de o parte și de alta a cuibului. *Recoltarea* se realizează după ce acești faguri au fost centrifugați pentru îndepărtarea mierii. Se decupează porțiunile cu păstură, se secționează longitudinal rîndurile de celule, iar cu ajutorul unui băț de chibrit ascuțit se detașează păstura. *Conservarea* acesteea se face în borcane de sticlă colorată, iar pe fagurii care au celu-

lele cu păstură necompletată cu miere, se presară deasupra zahăr pudră sau se adaugă miere fluidă. Păstura trebuie ferită de ger, uscăciune și umiditate mărită.

BOLILE ALBINELOR sînt grupate în două categorii : contagioase și necontagioase.

4.7. BOLILE CONTAGIOASE

4.7.1. BACTERIOZE

Loca europeană apare la puietul necăpăcit, fiind produsă de un complex de bacterii : *Bacillus pluton, B. alvei, B. eurydice, B. orpheus, Streptococcus apis*. Larvele bolnave devin neliniștite, moi, mai transparente putîndu-se evidenția traheele și tubul digestiv, își schimbă culoarea din albă-sidefie în cenușie, galbenă și cafenie închis, emană un miros caracteristic — acru sau de putrefacție și au o poziție anormală în celulă, încît pe fagure apare aspectul de puiet „împrăștiat" (fig. 121).

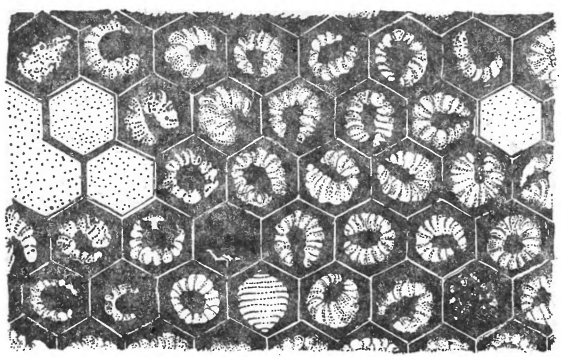


Fig. 121. Locă europeană.

Conținutul larvar nu este filant (nu se întinde), iar corpul nu aderă de pereții celulei, încît scoaterea și eliminarea larvelor este ușor de realizat. Combaterea se face prin : distrugerea fagurilor cu mult puiet bolnav, transvazarea familiilor bolnave în stupi dezinfectați, unirea familiilor slabe, schimbarea mătcilor și tratament cu streptomicină administrată în sirop, zahăr pudră sau sub formă de pastă. În cazuri de infecție mixtă, loca europeană cu cea americană se folosește teramicină.

Loca americană este produsă de *Bacillus larvae* la puietul căpăcit de obicei după culesul de salcîm. Boala se recunoaște după : prezența celulelor cu căpăcele înfundate, mai închise la culoare și uneori perforate, aspectul „împrăștiat" al puietului pe fagure (fig. 122), moartea larvelor după căpăcire, consistența viscoasă, filantă și aderența lor la pereții celulei neputînd fi scoase din interior, miros de clei de tîmplărie încins

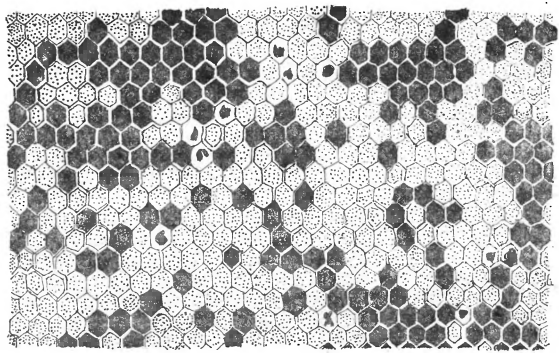


Fig. 122. Locă americană.

etc. Prevenirea se realizează prin : evitarea contactului direct sau indirect dintre o familie de albine sănătoase și alta bolnavă și menținerea în permanență a familiilor puternice. Combaterea constă în : distrugerea familiilor bolnave și a fagurilor cu semne de boală, unirea celor slabe sănătoase, schimbarea mătcilor, înlocuirea treptată și reformarea în maximum 2 ani a tuturor fagurilor din familiile infectate, dezinfecții riguroasă a stupilor infectați și a obiectelor cu care s-a lucrat, dezinfecția curentă, anuală, a tuturor stupilor. Tratamentul se face cu sulfatiazol și teramicină.

Septicemia se întîlnește la insectele adulte, datorită agentului patogen *Bacillus apisepticus*. Ele manifestă mișcări lente, nesigure, pierd capacitatea de zbor, se tîrăsc afară din stup și mor. Corpul lor devine fragil, iar articulațiile se descompun (fig. 123). Se combate cu antibiotice.

Paratifoza (salmoneloza) este o boală sporadică, al cărei agent patogen este *Bacillus paratyphi alvei*. Albinele bolnave nu mai pot zbura, au abdomenul balonat, diaree, paralizează și mor. Combaterea se face prin măsuri de igienă și tratament cu teramicină sau streptomicină.

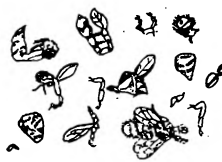


Fig. 123. Albine moarte de septicemie

4.7.2. VIROZE

Puiet saciform apare la larvele de curînd căpăcite și este determinat de un virus filtrabil, preluat prin hrană. Ele devin galbene, cenușii sau brune, cu capul mai închis la culoare. În prima fază au aspectul unor pungi cu lichid, fără miros, iar după moarte corpul se transformă într-o crustă neaderentă (fig. 124 A, B). Se recomandă hrăniri cu cloromicetină, sulfatiazol combinat cu streptomicină sau numai teramicină.

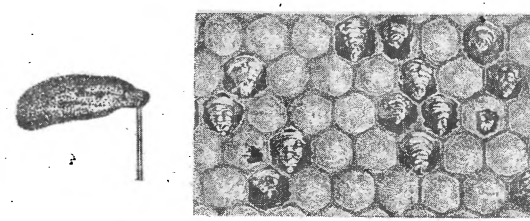


Fig. 124. A — Aspectul larvei moarte de puiet în sac ; B — fagure cu puiet în sac.

Boala neagră se referă la complexe de manifestări patologice, virale, cu simptome de depilație și culoare neagră. Se cunosc două forme: congenitală și de pădure.

Boala neagră congenitală se manifestă prin apariția unor albine negre, lucioase, mai mici decît cele obișnuite, cu aspect de furnici și trîntori neviabili. Caracterul ereditar este dovedit prin faptul că nu se propagă la familiile din jur, iar raportul dintre albinele bolnave și cele sănătoase se menține egal. Se recomandă schimbarea mătcii.

Boala neagră de pădure se caracterizează prin depilare, înnegrire și micșorarea dimensiunii corpului. Albinele bolnave se refugiază deasupra ramelor sau în partea opusă urdinișului, de unde sînt tîrîte afară de cele sănătoase, manifestînd pasivitate. Se indică schimbarea mătcilor și administrarea zilnică de sirop cald (35°C), cu adaos de lapte fiert 10%.

4.7.3. MICOZE

Ascosferoza (puietul vãros) este o boală a puietului căpăcit sau necăpăcit, produsă de ciuperca *Ascosphaera apis*. Se recunoaşte după : aspectul în mozaic al fagurilor şi sunetul caracteristic produs cînd sînt scuturaţi ; consistenţa de piatră moale a larvelor moarte şi neaderenţa lor la pereţii celulei ; răspîndirea larvelor mumifiate, albe sau vineţii în faţa sau pe fundul stupului (fig. 125). Se recomandă îndepărtarea fagurilor cu puiet bolnav şi pudrarea cu micocidin.

Fig. 125. Ascosferoză

Aspergiloza (puietul pietrificat) se manifestă la puiet şi albinele adulte, fiind provocată de *Aspergillus flavus* şi uneori de *A. niger*. Boala se caracterizează prin : aspectul de plăgi sau insule verzi, sub care apare ciuperca pe fagurele cu puiet ; consistenţa de piatră tare, sfărîmicioasă a larvelor mumifiate şi aderenţa lor la pereţii celulei ; îmbolnăvirea concomitentă şi a albinelor adulte. Metoda de combatere este distrugerea familiilor bolnave. Aspergiloza din stup poate să se transmită apicultorului, provocîndu-i o foarte gravă afecţiune pulmonară. De aceea, cînd lucrează trebuie să poarte o mască din pînză sau tifon, îmbibată într-un antiseptic.

Melanoza se datoreşte ciupercii *Melanosella mors apis*, care afectează aparatul genital al mătcilor şi glandele salivare ale lucrătoarelor. Contaminarea mătcii se face de la lucrătoare, prin lăptişor. Ea încetează depunerea ouălor, prezintă mobilitate redusă şi excremente uscate la partea posterioară a abdomenului, iar ovarele se atrofiază şi sînt prevăzute cu aglomerări pigmentoase de nuanţă închisă. Se combate prin înlocuirea mătcilor.

4.7.4. PARAZITOZE

Nosemoza este o endoparazitoză foarte frecventă în ţara noastră. Agentul cauzal îl reprezintă protozoarul *Nosema apis*, care se localizează în intestinul mijlociu şi posterior al albinelor adulte şi în epiteliul tuburilor malpighiene (fig. 126 a, b), iar sporii sînt eliminaţi cu excrementele în stup. Semnele bolii sînt : activitate redusă primăvara sau după perioadele reci şi ploioase vara ; depopularea familiilor cu toate că puietul este sănătos şi relativ numeros ; apariţia fecalelor diareice brune-gălbui pe şi în interiorul stupului ; prezenţa unor albine moarte sau bol-

nave în fața stupului, acestea din urmă manifestînd tremurături, paralizie, abdomenul umflat. Mătcile sînt foarte receptive la nosemoză. Tratamentul se face cu Fumidil B, asociat cu măsuri de ordin igienic și biologic.

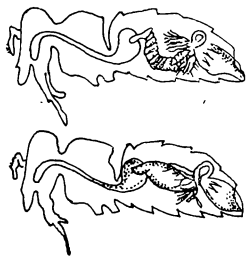


Fig. 126. Nosemoză : a — intestinul albinei sănătoase ; b — intestinul albinei bolnave.

Amibioza, endo*parazitoză*, produsă de protozoarul *Malpighamoeba mellificae* se instalează, de asemenea, în intestinul și sistemul excretor al albinelor adulte. Boala se manifestă prin : abdomen mărit, diaree și tulburări nervoase. În combatere se aplică aceleași măsuri de profilaxie ca la nosemoză.

Acarioza, endoparazitoză, deosebit de dăunătoare, nesemnalată pînă în prezent în țara noastră, se datorește acarianului *Acarapis woodi*, a cărui femelă depune ouă în traheele albinelor adulte și mătcilor producîndu-le asfixierea (fig. 127). Albinele bolnave cad pe pămînt și nu mai reușesc să zboare, tremură, țin aripile depărtate și se adună în grupe mici înainte de a muri. Se tratează cu preparatul Folbex.

Fig. 127. Acarioză (trahee cu acarieni).

Brauloza, ectoparazitoză, produsă de păduchele albinelor *Braula coeca* (fig. 128) la lucrătoare și mătci. Larvele acestui parazit sapă în faguri o rețea de canale, în care se dezvoltă și consumă ceară și polen. Adulții se alimentează cu hrana din gușa albinelor, în momentul cînd

și-o trec de la una la alta sau provocîndu-le reflexul de regurgitare, prin excitarea aparatului lor bucal, cu picioarele anterioare. Tratamentul se efectuează cu fenotiazină.

Varooza apare la puiet și albinele adulte, fiind provocată de acarianul *Varroa jacobsoni* (fig. 129). Albinele parazitate se debilitează. Se combate cu sineacar.

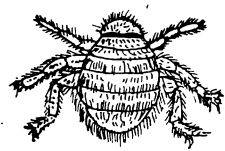


Fig. 128. Braula coeca

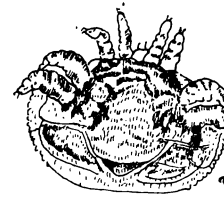


Fig. 129. Varroa jacobsoni.

Senotainioza este produsă de larvele dipterului vivipar *Senotainia tricuspis* depuse în zbor pe corpul albinelor, de unde pătrund în cavitatea toracică și se hrănesc cu hemolimfă. Albinele parazitate nu mai pot zbura. Se combate prin capcane instalate pe capacul stupului.

Triungulinoza, reprezintă o ectoparazitoză cauzată de larvele coleopterelor *Meloe variegatus* și *M. proscarabeus* care se găsesc printre flori, se prind pe corpul albinelor, ajung cu acestea în stupi, pătrund în cavitatea abdominală, consumă hemolimfa și contuzionează țesuturile. Albinele prezintă mișcări spasmotice și dezordonate. Combaterea se face prin fumigație cu fenotiazină.

4.8. BOLI NECONTAGIOASE

Puietul răcit apare primăvara, cînd o parte din acesta a rămas descoperit, iar temperatura a scăzut brusc. Larvele bolnave au forma și consistența normală, însă fără luciu. Se indică micșorarea cuibului.

Diareea este determinată în timpul iernii de : miere necorespunzatoare, zgomote, lipsa mătcii, oscilațiile de temperatură etc. Se tratează cu sirop călduț cu penicilină.

Anomalia mătcilor o constituie „mătcile trîntorițe", din ale căror ouă rezultă generații de trîntori. Ele trebuie înlocuite cu mătci normale.

Intoxicațiile se datoresc polenului și nectarului toxic, mierii de mană, excesului de medicamente, stropirilor cu substanțe chimice. Preventiv, se închid stupii în timpul tratamentului sau se transportă pe altă vatră.

4.9. DĂUNĂTORII ALBINELOR

Produc stricăciuni și contribuie la micșorarea populației de albine din cuib.

Găselnița sau molia fagurilor aparține la două specii de lepidoptere : *Galleria mellonella* (fig. 130) și *Achroea grisella*. Larvele sapă galerii în faguri, protejate de numeroase fire de mătase, iar în drumul lor pro-

voacă moartea sau asfixierea larvelor și nimfelor de albine. Se hrănesc cu ceară, păstură și resturi de puiet. Adulții trăiesc în afara stupului, iar femela pătrunde în cuib pentru a depune ouă. Preventiv, fagurii se dezinfectează cu acid acetic glacial, anhidridă sulfuroasă sau galecid.

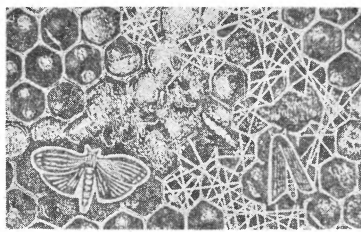


Fig. 130. Faguro atacat de *Galleria mellonella* (găselniță).

Viespile intră în stupi după miere sau atacă albinele. Astfel, *Vespa crabro,* pindește albinele la urdiniș, apoi le atacă din zbor. Combaterea se face pulverizînd în cuiburile lor insecticide.

Lupul albinelor *(Philanthus triangulum)* prinde albinele la urdiniș, în zbor și pe flori, le fixează între picioare, apoi, cu unele se hrănește, iar pe altele le transportă la cuib pentru larve. Se combate prin distrugerea cuiburilor, cu insecticide sau prin lovire cu palete.

Fluturele cap de mort *(Acherontia atropos)* pătrunde în stupi noaptea și suge pînă la 20 g miere. Nu produce pagube mari prin consumul mierii, dar stînjenește activitatea normală numai prin prezență și mișcările zgomotoase ale aripilor. Împotriva lui se aplică gratii rare la urdiniș sau se micșorează înălțimea acestuia la 8 mm.

Furnicile aparținînd mai multor specii intră în stupi prin crăpături și urdiniș, fură miere, neliniștesc și citeodată atacă albinele. Apărarea se face prin ungerea suporturilor (picioarelor) stupilor cu păcură sau prin așezarea sub acestea a unor cutii cu petrol și cordoane de sare. Se pot desface mușuroaicle, se presară insecticide, apoi se acoperă pentru a nu fi afectate albinele.

Broaștele și *șopîrlele* atacă albinele în fața stupilor, dacă aceștia sînt așezați prea jos sau direct pe pămînt și la locurile de cules cînd florile nu sînt înalte.

Prigoria răpește în special albinele care se întorc la stupină încărcate, avînd zborul mai greoi și lin. Alte păsări care consumă albine sînt : *ciocănitoarea, rîndunica, pițigoiul, vrabia.*

Șoarecele de casă și *cel de cîmp* sînt mari dușmani ai albinelor. Combaterea trebuie făcută în împrejurimile stupinelor cu substanțe chimice, iar apărarea prin aplicarea de gratii la urdinișuri.

Ursul poate distruge multe familii de albine, producînd pagube foarte mari.

Printre *plantele dăunătoare* se înscriu : *mohorul, otrățelul de baltă, roua cerului* etc., care prind albinele cu țepii spicelor sau cu cleiul pe care îl secretă.

5. COLECTAREA, STUDIEREA ŞI CONSERVAREA VERTEBRATELOR

5.1. COLECTAREA ŞI PĂSTRAREA MATERIALULUI VIU ÎN LABORATOR

Peştii pot fi prinşi de către majoritatea colectorilor cu undiţa. Pentru ciprinde se folosesc ca momeli mai ales boabe de porumb crude sau uscate, boabe de grîu, cocoloaşe de mămăligă, rîme, lăcuste, larve de chironomide, muşte, omizi, viermi, etc.

Pentru peştii răpitori se folosesc broaşte, intestine de păsări, brînză şi momeli artificiale.

La scoaterea din apă a peştilor se foloseşte minciogul (fig. 131 A). Acesta este format dintr-o ramă metalică şi o plasă cu ochiuri de 30—40 mm. Peştii se ţin în coşuri, cu pereţii din plasă de nailon sau din fire de bumbac.

Alte unelte folosite la colectarea peştilor sînt: draga, volocul, crîsnicul, virşa de nuiele (fig. 131 B, C, D, E). Uneori braţe mici de rîuri pot fi răstocite colectîndu-se tot materialul piscicol rămas. Trebuie men-

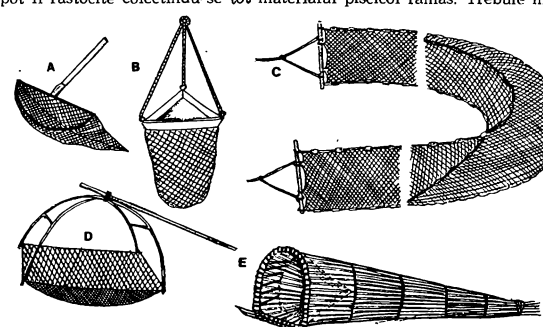


Fig. 131. Tipuri de unelte de pescuit: A. minciog; B. dragă; C. voloc; D. crîsnic: E. virşă de nuiele.

ţionat însă că folosirea acestor unelte este prohibită de lege. Ele se pot folosi în scop ştiinţific numai cu aprobarea forurilor în drept.

Dacă locul de colectare nu este prea departe de laborator, atunci peştii se învelesc pe rînd într-o bucăţică de pînză şi se pun mai mulţi într-un borcan. Înainte de conservare peştii se spală cu apă rece pentru înlăturarea excesului de mucus.

Dacă dorim să păstrăm materialul viu în laborator pentru observaţii sau disecţii este necesară confecţionarea unui acvariu. Cele mai bune acvarii se confecţionează din rame de fier cornier (fig. 132), cu

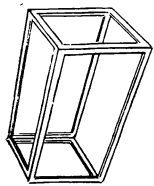


Fig. 132. Schelet de fier cornier pentru acvariu.

pereţii de sticlă sau de plexiglas. Acvariile pentru peştii buni înotători ca şi cele folosite pentru reproducere trebuie să aibă înălţimea (H) egală cu lăţimea (l) iar lungimea (L) să fie de 1,5—2,5 ori mai mare (fig. 133 A, B). În cazul expunerii unor specii ornamentale înălţimea

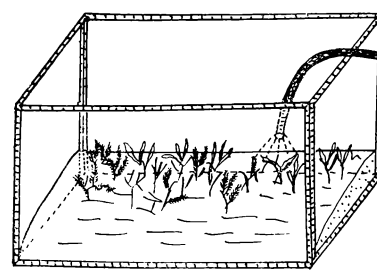


Fig. 133 A — Tip de acvariu

trebuie să fie mai mare decît lăţimea, lungimea păstrînd proporţiile amintite. Dimensiunile obişnuite ale unui acvariu de capacitate mică (10—15 litri) sînt 20 x 30 (sau 40) cm. Dimensiunile unui acvariu de capacitate mijlocie sînt : 30 x 30 x 45 (sau 60) cm, de aproximativ 40—50 litri.

Scheletul metalic al acvariilor se confecţionează din fier cornier, calculîndu-se dimensiunile acestuia şi respectînd unghiurile de îmbi-

nare ale ramelor (superioară și inferioară) și ale celor 4 colțare. Piesele metalice sînt sudate numai la exterior. În cazul unui acvariu de 50 x 25 x 25 cm, se folosește fier cornier de 25 x 25 x 3 mm (cu grosimea tablei de pe fund de 1 mm), iar în cazul unui acvariu mai mare, 80 x 30 x 40 cm, se folosește un fier cornier cu dimensiunile de 30 x 30 x 4 mm, cu grosimea tablei de pe fund de 1,5 mm.

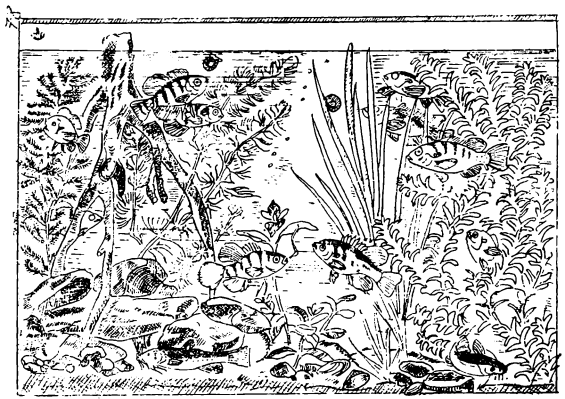


Fig. 133 B. Acvariu amenajat

Pentru a împiedica ruginirea scheletului metalic, acesta se curăță bine cu o perie de sîrmă și se aplică un strat protector de miniu de plumb. Acesta se prepară astfel : la 1 kg ulei de in dublu fiert se adaugă 0,500 kg miniu de plumb. După ce se amestecă, se vopsește rama metalică la interior și la exterior, aplicîndu-se de 2 ori vopsirea. Se mai poate aplica și un alt produs anticoroziv pe bază de clor cauciuc (folosit pentru marcat șoselele) tot în două straturi.

Grosimea sticlei de geam diferă în funcție de dimensiunile acvariului. Pentru acvariile mici (de 30 x 30 cm) se folosește sticlă groasă de 2,8 mm, iar pentru cele mai mari (60 x 50 cm) se folosește sticlă de 6,5 mm. Sticla cea mai bună pentru acvarii trebuie să fie incoloră, fără ape verzui.

Geamurile de sticlă se montează cu ajutorul unui chit special care se poate prepara din : 2 kg cretă, 1 kg miniu de plumb, peste care se adaugă 0,400 kg ulei de in dublu fiert. Uleiul de in se adaugă puțin cîte puțin. Pasta obținută prin amestec și frămîntare se lasă pînă a

doua zi într-un loc călduros, pusă într-un vas de sticlă. A doua zi se frămîntă din nou pînă cînd chitul devine moale și elastic.

După un alt procedeu chitul poate fi preparat amestecînd 1 litru de nisip foarte fin (cernut) cu un litru de ipsos, 500 g oxid de plumb și 70 g sacîz, la care se adaugă ulei de in.

Montarea geamurilor se face într-o anumită ordine: întîi geamul de pe fundul acvariului (frămîntînd întîi chitul sub formă de șnururi așezate pe marginea geamului și întorcîndu-l apoi cu chitul în jos). Geamul se apasă cu palma, evitînd ca să rămînă aer între sticlă și chit. Presarea trebuie făcută cît mai uniform, iar chitul în exces se îndepărtează cu un cuțit. Se montează întîi cei doi pereți laterali lungi și apoi pereții laterali mici. Apa se pune în acvariu după întărirea chitului (după 3—10 zile). Acvariul este vopsit apoi cu vopsea de ulei sau cu lac. Deasupra acvariului se pune o placă de sticlă, care nu se așază direct pe rama metalică ci pe niște plăcuțe de metal dispuse pe muchiile ramei, pe care se pun bucăți de cauciuc.

Pe fundul acvariului se pune nisip, în special nisip de cuarț, luat din rîuri. Nisipul se cerne, se spală foarte bine într-un vas. Spălarea se repetă de cel puțin 35—40 ori pentru eliminarea tuturor impurităților. Apoi se fierbe și se spală din nou de cîteva ori. Se așează oblic în acvariu, înclinat spre partea din față, loc unde se adună impuritățile și pot fi îndepărtate mai ușor, cu o pipetă. Dacă se introduc plante acvatice în acvariu, atunci sub stratul de nisip bine spălat (gros de 4—5 cm) se introduce nisip mai puțin spălat sau pămînt afînat (de la mușuroaiele de cîrtiță). Pentru decorare se folosesc pietre, bucăți de roci, scoici, etc. Plantele acvatice înainte de sădire sînt curățate de frunzele vechi și dezinfectate cu o soluție diluată de permanganat de potasiu. Ele se introduc în general înainte de umplerea acvariului cu apă. Se sădesc în găuri făcute cu un bețișor în nisip sau în ghivece, care se îngroapă apoi în substrat. Locul unde au fost plantate se protejează presînd nisipul împrejur cu ajutorul unor pietre. Plantele mai mari sînt înfipte izolat în spatele acvariului, cele mici în mijloc, iar tufele către pereții laterali. Dintre plantele acvatice folosite în alcătuirea unui acvariu menționăm: *Vallisneria spiralis, Elodea canadensis, Ceratophyllum demersum, Ceratophyllum submersum, Myriophyllum verticillatum, Lemna minor, Sagittaria sagittifolia*, etc.

Apa care se introduce în acvariu trebuie să stea 24 ore într-o găleată, pentru eliminarea clorului. Apa se toarnă încet cu ajutorul unui vas, după ce s-a pus o hîrtie deasupra plantelor și a substratului. După umplerea acvariului cu apă (lăsînd 2—3 cm liberi în înălțime) se scoate hîrtia protectoare. Cînd apa se schimbă din acvariu, aceasta este eliminată cu ajutorul unui tub de cauciuc sau a unor sifoane de sticlă atașate la tuburi de cauciuc. Acvariile sînt plasate în locuri bine iluminate, orientate spre est sau vest. Pot fi montate mai multe pe suporturi (fig. 134) sau supraetajat. Oxigenarea apei este asigurată de un vibrator iar iluminarea de becuri fluorescente. În perioada de reproducere sau iarna este necesară încălzirea apei prin introducerea unor încălzitoare în acvariu.

În şcoli pot fi crescuţi uşor peşti indigeni, ca : *Rhodeus amarus* (boarţa), *Misgurnus fossilis* (ţiparul), *Cyprinus carpio* (crapul), *Carassius auratus gibelio* (carasul argintiu), *Tinca tinca* (linul), *Rutilus rutilus* (ba-

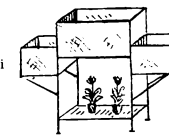


Fig. 134. Montarea mai multor acvarii pe suporturi metalice.

buşca), (specii paşnice) şi *Perca fluviatilis* (bibanul), *Acerina cernua* (ghiborţul), *Ictalurus nebulosus* (somnul pitic), *Lepomis gibbosus* (bibanul soare) (specii răpitoare). Peştii paşnici se ţin în acvariu cu vibrator şi filtru, revenind un peşte de 6—7 cm la 3 litri apă. Temperatura apei poate să varieze între 5—23°C. Pe fundul acvariului se pun pietre şi bucăţi de stuf, iar ca plante : *Sagittaria, Alisma plantago, Elodea, Ludwigia,* etc.

La răpitori, temperatura acvariului poate să oscileze între 5—20°C. Se introduce un peşte de 8 cm, la 6 litri de apă. Substratul va cuprinde pietre, bucăţi de stuf. Plantele recomandate pentru plantat sînt : *Elodea, Myriophyllum, Sagittaria, Vallisneria.*

Cînd peştii înoată la suprafaţă şi au mişcări respiratorii dese (început de asfixie) apa trebuie înlocuită parţial. Această înlocuire nu trebuie să depăşească 1/3 din volumul total al apei. Se impune schimbarea întregului volum de apă doar în cazul apariţiei unor boli. Peştii trebuie hrăniţi de 1—2 ori pe zi, iar hrana nu trebuie să fie în exces. Resturile neconsumate şi excrementele trebuie înlăturate cu ajutorul unei pipete speciale, odată la două săptămîni (fig. 135 B). Pereţii acvariului trebuie curăţaţi periodic cu un răzuitor cu lame sau cu o cîrpă (fig. 135 A).

Hrana peştilor este alcătuită în general din purici de apă (dafnii), administraţi în stare proaspătă sau uscaţi. O hrană vie uşor de obţinut se compune din viermi (Oligochete) aparţinînd speciei *Enchytraeus albidus*. Aceste enchitreide se întîlnesc în sol, sub frunzarul pădurilor şi pot fi crescute uşor în cutii de lemn cu capac, pe fundul cărora se pune pămînt de pădure. Se introduce în acest substrat un cuib de viermi, care vor fi hrăniţi săptămînal cu legume fierte, paste făinoase, pîine neagră. Temperatura optimă este de 16—18°C. Pot fi luaţi cu pensa din sol şi apoi spălaţi înainte de a fi daţi ca hrană peştilor. Peştii mai pot fi hrăniţi cu rîme, viermi *Tubifex*, larve de insecte (diptere — *Chironomus).* Puietului abia eclozat i se administrează ca hrană ciliate sau infuzori obţinuţi din infuzii de fîn sau gălbenuş de ou fiert, diluat cu puţină apă din acvariu.

Ciclostomii adulţi se colectează ca şi peştii cu ajutorul plaselor de pescuit, iar larvele lor se scot cu draga sau cu lopata din mîlul în care se găsesc şi după spălare se transportă vii. Se pot menţine în

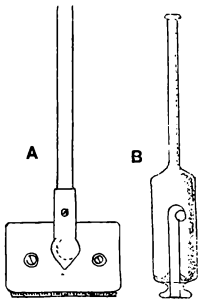


Fig. 135. Anexe ale acvaristului : A. curățitor al pereților acvariului ; B. pipetă absorbantă.

acvarii, la o temperatură scăzută (sub 15°C), într-o apă bine oxigenată și ferită de acțiunea directă a soarelui.

Amfibienii pot fi colectați mai ușor în perioada de reproducere (primăvara) din diferite bazine acvatice. Pentru colectarea lor din apă se folosesc ciorpace cu coadă, de 20—28 cm diametru, a căror pînză are ochiuri de 5 mm (fig. 136). Se trage cu ciorpacul și în zonele cu vegetație acvatică și în nămolul de pe fundul bălții. Ciorpacul se introduce sub broască și puțin înaintea ei, scoțîndu-l repede afară. În cazul apelor mai adînci se folosesc drăgi pentru colectare. În zonele unde amfibienii se adună în număr mare pentru depunerea pontei se pot folosi dispozitive de iluminat care îi atrag și permit capturarea lor mai ușor.

Tritonii pot fi colectați din bălți mici în perioada de reproducere sau de sub butuci și rădăcini de copaci la începutul toamnei (septembrie). Dacă suprafața solului este întărită, tritonii pătrund în găurile de rozătoare sau în locurile unde au putrezit rădăcini, pînă la o adîncime de 20—30 cm. Se caută cu grijă la baza copacilor, pe sub frunzele uscate, observînd atent suprafața solului descoperit. Pămîntul este îndepărtat cu lopata și tritonii se iau cu mîna sau cu pensa. Cînd sînt ploi abundente atunci ei ies din ascunzișuri și pot fi prinși mai ușor.

Broaștele rîioase (bufonide) pot fi colectate ziua scoțîndu-le din găurile adînci, unde se ascund, sau noaptea cînd ies la vînat insecte. Pentru a le observa pe întuneric folosim o sursă de lumină, o lanternă sau o lampă de miner.

Broaștele de apă (broaștele verzi) se prind cu ciorpacul din apă sau de pe uscat, unde se însoresc. Se pot colecta și cu undița folosind ca nadă un fir roșu sau o insectă artificială care este mișcată în fața broaștei.

Broțăceii se colectează la începutul primăverii din apă, unde intră să depună ponta, sau de pe ramurile copacilor din apropierea bazinelor acvatice.

Broaștele roșii se colectează cu ciorpacul primăvara din diferite bazine acvatice sau cu mîna de pe sol, din păduri și fînețe, vara, dimineața sau seara. După ploi abundente pot fi colectate și în timpul zilei.

Pontele și stadiile tinere de dezvoltare postembrionară pot fi ușor colectate cu ciorpacul, dar nu trebuie luate decît mostre, pentru a nu distruge populația de amfibieni.

Transportarea materialului se face în săculețe de pînză (fig. 137), sau în coșulețe pescărești de sîrmă, care trebuiesc ferite de soare. Înainte de a introduce animalele, pe fundul săculețelor sau a coșulețelor se pune fie mușchi umezit, fie turbă — de asemenea umedă. Nu se pun prea multe exemplare la un loc (nu mai mult de 6) pentru a nu se asfixia. Pontele și mormolocii se transportă într-un borcan cu puțină apă. Dacă distanța de la locul colectării la laborator este mare atunci se fixează direct pe teren.

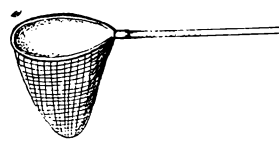


Fig. 136. Ciorpac.

Fig. 137. Săculeț de pînză pentru transportat amfibienii și reptilele colectate pe teren.

În laborator amfibienii pot fi ținuți în acvaterarii, iar tritonii, broaștele verzi și buhaii de baltă chiar în acvarii la temperatura camerei. Se hrănesc cu viermi vii, insecte și larve. Tritonilor li se pot da bucățele de carne, care sînt mișcate în apă cu ajutorul unei pense, rîme mici, dafnii. Pot fi ținuți și iarna în lăzi, la o temperatură cuprinsă între 0° și 4—5°, fără a fi hrăniți. Este absolut necesară menținerea unei anumite umidități și de aceea se pune o cîrpă udă.

Deoarece secrețiile tegumentare ale amfibienilor sînt toxice și pot provoca inflamații ale mucoaselor, cel ce le manipulează trebuie să se spele pe mîini bine cu apă și săpun.

Reptilele se colectează cu mîna (broaștele țestoase, unele șopîrle și șerpii neveninoși). Pentru surprinderea lor trebuie atît răbdare și iuțeală în mișcări cît și o bună cunoaștere a biotopilor. Animalele trebuie capturate primăvara sau la începutul verii cînd soarele nu este prea puternic. Femelele sînt în general mai greoaie, mai ales înainte de depunerea pontei. Nu se apucă șopîrlele de coadă, pentru că și-o lasă (autotomie) și fug. Pentru prinderea șopîrlelor se folosește o nuia flexibilă, cu care se lovește animalul pe spate sau latul herpetologic (fig. 8 A). Latul este confecționat dintr-un fir de sîrmă de cupru de 0,15 mm diametru, legat de o ață de lînă sau de un fir de păr alb de cal. Pe sîrma de cupru se fixează ața sau părul obținîndu-se o deschidere prin care animalul să alunece ușor. Sîrma se prinde de un băț de stuf sau de alun, lung de 1,5—2 m. Se așteaptă în spatele șopîrlei momentul potrivit, se trece latul peste capul acesteia și se ridică brusc

bățul. Șopîrla ridicată în sus trebuie apucată repede și introdusă într-un ciorpac, ca să nu se zbată. Mai pot fi capturate șopîrlele și prin metoda îngropării de borcane în apropierea locurilor pe care le frecventează acestea în mod obișnuit. Dacă substratul este pietros, se acoperă marginea lucioasă a borcanelor cu pietricele. În interior se pun și „viermi de făină", pește sau fructe. Pe teren nisipos se pot face găuri de 1 m adîncime și 40 cm lățime, pe fundul cărora se pun alimente. Șopîrlele cad în aceste găuri și pe măsură ce se zbat se prăbușesc la loc. Uneori, cînd se observă locul unde s-au ascuns șopîrlele se poate pulveriza cloroform, după care sînt luate cu mîna. Pentru șerpi se folosesc bețe cu bifurcație la vîrf (cu o bucată de piele la capăt) (fig. 138 B) sau cleștii de metal pentru vipere.

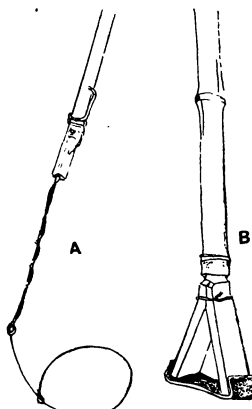


Fig. 138. Unelte de colectat reptile: A. laț herpetologic; B. băț tip crăcană pentru colectat șerpi.

Se apasă pe corpul șarpelui cît mai aproape de cap, apucîndu-l apoi cu mîna. Reptilele se transportă în săculețe de pînză (de culoare închisă pentru șerpi veninoși) sau de lînă. Nu se recomandă cutiile de tablă, închise la gură, pentru transport deoarece se înfierbîntă la soare și animalele mor. Broaștele țestoase se pot transporta în pungi de plastic. Șerpii se pot colecta și toamna, în zilele cu soare, cînd încep să se adune pentru iernat.

Reptilele pot fi ținute vii în laborator în terarii, cu dimensiunile de 100/50/60 cm, (fig. 139), sau 50/40/40 cm. Acestea sînt prevăzute cu vas pentru apă, nisip și locuri unde să se poată ascunde. Așezarea terariului trebuie să permită doar expunerea parțială la lumină, pentru evitarea căldurii în exces.

Șopîrlele pot fi hrănite cu „viermi de făină", insecte și bucățele de carne; șerpii de casă cu broaște.

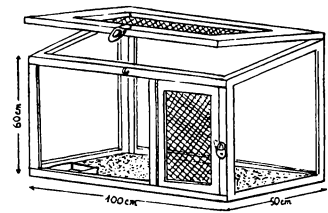


Fig. 139. Terariu.

Broaștele țestoase de apă se țin în acvarii, în care nivelul apei nu trebuie să depășească decît puțin carapacea. Se hrănesc cu melci, pești, bucățele de carne.

Țestoasele de uscat se țin în camere cu ciment pe jos sau în grădină și se hrănesc cu plante : trifoi, salată, varză, legume.

Păsările se pot colecta prin vînare, în afara perioadei de reproducere, pe bază de permise speciale. O metodă larg folosită în scopuri științifice constă în folosirea de plase sau curse, care vor fi așezate la liziera pădurilor, stufărișuri, locuri unde păsările vin să bea apă, etc. Plasele pentru capturat păsări sînt de fabricație japoneză sau engleză, dar în ultimul timp s-au fabricat și în țara noastră. Se folosesc plasele de acest tip mai ales în scopul inelării păsărilor. Ele sînt întinse între două suporturi (picheți) prinse cu sfoară de niște cuie de metal sau de lemn (fig. 140 A). În zona unde se amplasează plasa, vegetația este

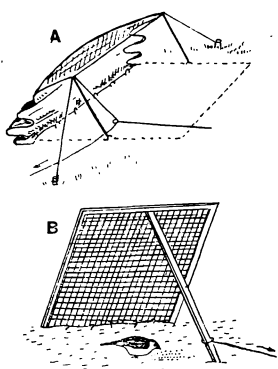


Fig. 140. Plase pentru capturarea păsărilor ; A. plasă japoneză ; B. cursă căzătoare.

îndepărtată pe circa 2 m. Plasele nu se fixează pe un fundal care le-ar face ușor vizibile. Culoarea lor trebuie să fie închisă (neagră, brună) sau albă (pentru zăpadă). Controlul plaselor trebuie făcut de mai multe ori pe zi. Păsările capturate se introduc cîte una în săculeți de pînză rară, de culoare închisă, legîndu-se în partea posterioară cu un șnur. Răpitoarele se manipulează cu mănuși. Păsărilc de talie mai mare pot fi transportate în cutii de carton perforate. Capcanele utilizate pot fi : lațuri din păr de cal, curse căzătoare, curse pentru păsărele, pentru ciori, curse cu clapă, etc. Pentru atragerea păsărilor în locurile unde s-au montat capcanele, se folosesc sunete înregistrate pe bandă de magnetofon. Cele mai simple sînt cursele căzătoare ; ele constau dintr-o plasă montată pe un cadru de lemn, înclinată la 45—60° cu ajutorul unui suport (fig. 140 B). De acest suport de lemn este prinsă o sfoară, care poate fi trasă de la distanță ; plasa căzînd astfel prinde păsările sub ea. Se montează în general în locurile unde păsările vin să-și caute hrana.

Mamiferele mari cu importanță cinegetică sînt obținute prin vînare, pe baza unor autorizații eliberate de forurile competente.

Mamiferele mici pot fi capturate cu ajutorul unor capcane adecvate mărimii și obiceiurilor lor. Se pot folosi două tipuri de capcane pentru insectivore și rozătoare.

1. Capcane cu arc (pasive) formate dintr-un suport de lemn și cu un sistem de sîrme care prin atingerea momelii declanșează un arc, ce omoară animalul pe loc (fig. 141).

2. Capcane de prins animale vii (active) construite din lemn (fig. 142), foi metalice, sau plasă de sîrmă cu ochiuri de 0,5 cm. Capcanele tre-

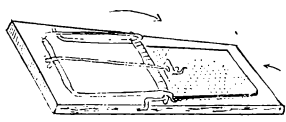


Fig. 141. Capcană cu arc pentru mamifere mici.

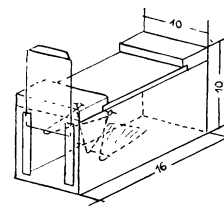


Fig. 142. Capcană pentru colectat mamifere vii.

buie așezate la intrarea vizuinilor, peste potecile folosite frecvent de mamifere ca drumuri de acces sau sub copacii desrădăcinați (în rezervațiile forestiere).

Alte dispozitive de capturat mamifere vii sînt vasele de sticlă, de pămînt, cilindrii și conurile de metal (fig. 143 A, B). Diametrul cilindrilor este de 12—15 cm, iar înălțimea lor de 50 cm. Dacă cilindrii au mărimi diferite se pot transporta mai ușor pe teren, introducîndu-se unul în altul. Ei trebuiesc scufundați profund în sol, încît marginea lor să ajungă la suprafața solului. Nu pot fi utilizați în zone pietroase.

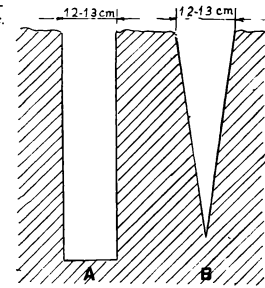


Fig. 143. Dispozitive pentru capturat mamifere vii : A. cilindru ; B. con metalic.

Rozătoarele mici pot fi capturate tot anul, dar cu mai mult succes primăvara și toamna pînă la începutul iernii. Șoarecii de cîmp pot fi prinși în număr mare cînd se ridică snopii și căpițele de păioase și fîn de pe cîmp.

Popîndăii și hîrciogii se colectează fie prin săparea galeriilor în care trăiesc, fie turnînd cantități mari de apă pe intrarea principală în vizuină (pînă la 7 găleți). Apa nu se toarnă brusc pentru a nu îneca animalele, ci treptat. Popîndăii uzi, ce ies din galerii, se prind cu un ciorpac sau cu un sac pus la gura vizuinii. Apoi se trec într-o cușcă.

Aricii pot fi prinși cu mîna în perioada călduroasă a anului. Sînt mai ușor de observat seara cînd ies în căutarea hranei. Sub acțiunea unei surse luminoase ei se sperie și se fac ghem. Astfel sînt luați și introduși în cîte o pungă.

Pentru cîrtițe se folosesc capcane din sîrmă groasă (fig. 144 A, B) introduse cîte două în galeriile subterane (cu fețele în direcție opusă). Cîrtițele pot fi scoase și cu ajutorul unei cazmale, introdusă brusc în sol imediat ce se observă că se ridică o moviliță de pămînt proaspăt.

Liliecii pot fi capturați cu plase din locurile unde se odihnesc sau se scot cu pensa din scorburi sau din crăpăturile stîncilor, în cazul speciilor mai puțin gregare.

Ca momeală pentru rozătoare se folosesc bucăți de pîine prăjită sau îmbibată în ulei, nuci, morcov, sfeclă. Pentru pîrși se recomandă fructe, nuci, alune, pîine unsă cu marmeladă. Chițcanilor li se pune ca momeală carne afumată. Pe vreme ploioasă momeala trebuie schimbată mai des. Eficiența momelii depinde de specie și de anotimp, ca și de gradul de accesibilitate la hrana naturală.

În laboratoare, mamiferele mici pot fi ținute în terarii sau în cuști speciale cu pereții de lemn (perforați) (fig. 145), cu acoperiș din metal și cu o deschidere. Interiorul cuștilor trebuie prevăzut cu material din care animalul să-și poată confecționa un cuib (fîn, paie, vată) și cu o cutie de lemn în care mai mulți indivizi să-și aranjeze cuiburile. Hrana adminstrată trebuie să fie de două feluri : uscată (grăunțe de orz, ovăz)

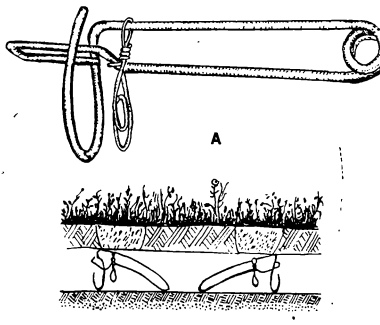


Fig. 144. Capcană de sîrmă pentru capturat cîrlițe (A) și amplasarea a două capcane în galerie (B).

și suculentă (morcov, iarbă verde). La arici se dau insecte, bucăți de carne, ouă, brînză de vaci. Este recomandabil ca aricii să fie ținuți într-o cameră rece și hrăniți numai în timpul experiențelor.

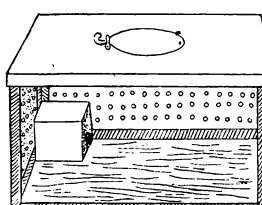


Fig. 145. Cutie pentru ținut rozătoare mici în laborator.

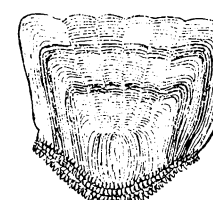


Fig. 146. Solz ctenoid de la un biban în vîrstă de 3 ani.

5.2. METODE FOLOSITE PENTRU DETERMINAREA VÎRSTEI

La nivelul țesutului osos al vertebratelor ritmurile sezoniere se exprimă printr-o succesiune de zone (depunere osoasă estivală) și de annuli (depunere osoasă hivernală) care formează „mărci naturale de creștere". Zonele sînt în general mai groase și opace, adesea vascularizate, iar annulii sînt de obicei înguști și constituiți din os lamelar avascular. Zonele și annulii alternează în grosimea osului periostic, fiind dispuse concentric și paralel cu suprafața externă a cortexului.

Posibilitatea aprecierii vîrstei pe baza structurii scheletice prezintă o mare importanță pentru ecologi. Aceasta permite estimarea vîrstei unor indivizi determinați și în cele mai multe cazuri a vîrstei lor la atingerea maturității sexuale; studierea variațiilor procentajelor creșterii înregistrate de țesuturile osoase în cursul anilor precedenți; realizarea de analize demografice eficiente; interpretări corespunzătoare la formele fosile, etc.

5.2.1. METODE DE DETERMINAREA VÎRSTEI LA PEȘTII OSOȘI

Solzii sînt folosiți mai des pentru determinarea vîrstei deoarece sînt mai ușor de prelevat. Pe suprafața lor se deosebesc, prin transparență, cîmpuri mai late și mai înguste, formate din lamele suprapuse de substanță osoasă (sclerite). Scleritele depuse iarna, cînd peștele nu se hrănește, sînt foarte apropiate, au puțin calcar și formează un cîmp transparent. În timpul verii scleritele sînt tot mai distanțate, formînd un cîmp mai bogat în calcar, mai opac (fig. 147). Solzii cei mai buni pentru citirea inelelor anuale trebuiesc recoltați de la baza înotătoarei dorsale, introducîndu-se apoi în pliculețe de hîrtie. La fiecare probă se anexează date referitoare la lungimea, greutatea, sexul individului de la care au fost luați solzii. Metoda se folosește cu rezultate

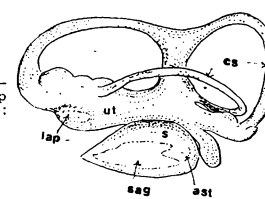


Fig. 147. Urechea internă la știucă: ast — astericus; cs — canale semicirculare; lap — lapillus; s — sacul; sag — sagitta; ut. — utricul.

bune la clupeide, salmonide, ciprinide și la unele percide. Înainte de a fi analizați, solzii sînt curățați cu o perie mică și apoi spălați cu apă curată. Ei pot fi ținuți 5—10 minute într-o soluție slabă de amoniac sau KOH 5%, după care sînt puși direct pe o lamă de sticlă sau sînt acoperiți cu silicat de sodiu sau amestec de glicerină și de gelatină. Observația se face direct la lupa binocular.

O altă tehnică constă în examinarea amprentei solzului, imprimată pe o lamă de material transparent (acetat de celuloză) cu ajutorul unei prese mici. Pe măsură ce peștii devin tot mai în vîrstă annulii devin din ce în ce mai apropiați între ei, tinzînd să se confunde spre periferia solzilor. În aceste cazuri este greu de stabilit vîrsta cu certitudine, dar la o populație care prezintă o structură demografică echilibrată, asemenea indivizi, sînt puțini numeroși. Pentru a limita posibilele erori este necesar să se examineze mai mulți solzi obișnuiți de la același pește, numărînd doar zonele care se găsesc pe solzi în aproximativ aceeași poziție.

Interpretarea datelor trebuie făcută cu prudență, deoarece uneori pot apare și inele false determinate de opriri accentuate în creștere produse de boli, răniri sau lipsă de hrană, variații bruște ale temperaturii, etc. Înainte de a identifica vîrsta pe baza citirii solzilor trebuie să cunoaștem precis condițiile de viață ale speciei și să ne asigurăm de valabilitatea rezultatelor obținute.

Otoliții sînt folosiți de multe ori pentru determinarea vîrstei deși prelevarea lor este mai dificilă decît a solzilor în special în cazul indivizilor de talie mare cu un craniu puternic osificat. Otoliții se găsesc în urechea internă a peștilor (fig. 148) și sînt alcătuiți din carbonat de

Fig. 148. Otolit de cambulă în vîrstă de 4 ani.

calciu, depozitat sub formă de cristale de aragonit într-o matrice proteică. Dacă peștii au tegumentul nud, au solzii foarte mărunți sau greu de citit, ca și în cazul formelor larvare, otoliții pot fi deosebit de valoroși. Principalul otolit utilizat este sagitta, care se găsește în sacul. În general este cel mai voluminos și pe suprafața sa se disting cercuri clare, și întunecate, ce corespund vîrstei peștilor (fig. 149). Otoliții extrași sînt

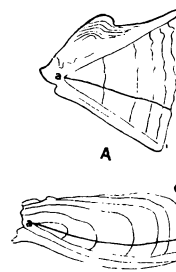


Fig. 149. A. os opercular de biban ; B. cleitrum de plătică.

spălați cu apă distilată, uscați și montați pe lame de sticlă, în mediu de montare permanent (balsam de Canada). Cei de talie mică sau prelevați de la indivizi tineri pot fi examinați întregi la binocular sau la microscop, în lumină reflectată și în lumină transmisă. Dacă este nevoie pot fi transparentizați, prin imersie în creozot 1—6 zile. Alți autori sînt de părere că după o prealabilă șlefuire trebuiesc introduși în HCl 4%, apoi spălați, uscați și examinați în creozot.

Cînd otliții au talie mare este necesar să fie secționați, iar secțiunea să fie șlefuită. Pe suprafața obținută prin secționare este picurat puțin HCl 1%, spălat după 15′ și apoi colorat în albastru de toluidină 1%. Se spală cu apă după cîteva secunde, obținîndu-se zonele de iarnă colorate intens violet. Dacă se produce supercolorație, se poate face diferențiere cu HCl 1% pînă cînd inelele apar colorate distinct. Procesul este oprit prin spălare cu apă. După uscarea la aer, peste otolit se pune o picătură de balsam de Canada, apoi se acoperă cu o lamelă. Prin montare colorația este protejată și se asigură o conservare de durată.

Alte formațiuni osoase pot constitui criterii de aprecierea vîrstei. Se folsesc secțiuni prin prima radie a pectoralei la sturioni și somn, oasele operculare la pleuronectide și percide (fig. 150 A), vertebrele la anguilide și pleuronectide (fig. 151), cleitrele la percide (fig. 150 B).

Fig. 150. Vertebră de anghilă în vîrstă de 6 ani.

Secțiunile pot fi șlefuite și clarificate cu alcool, glicerină sau toluen după ce au fost bine curățate piesele de carne, degresate în benzină și uscate. Examinarea acestora se face tot la binocular. Pe formațiunile

Fig. 151. Secțiune prin femur de *Bufo* în vîrstă de 2 ani; l.o.c. — linie de oprire a creșterii; l.r. — linie cimentantă de reversie; p.o.v. — pătură osoasă vascularizată; p.o.p.v. — pătură osoasă puțin vascularizată; o.end. — os endosteal.

osoase apar zone concentrice mai clare și mai late, care alternează cu zone mai întunecate și mai înguste. O zonă clară și una întunecată reprezintă un an din viața peștelui.

5.2.2. METODE DE DETERMINAREA VÎRSTEI LA AMFIBIENI

Pentru determinarea vîrstei amfibienilor se utilizează în special piese osoase (fig. 151). Semnele periodice de creștere se pot observa bine pe suprafețele articulare ale zigapofizelor, pe oasele plate sau

creste ale oaselor cilindrice. La oasele cilindrice, zonele de iarnă (annulii) se rezumă adesea la o simplă linie de oprire a creşerii (cu afinitate pentru hematoxilină), vizibilă şi în lumina polarizată. La urodele se pare că aceste linii nu sînt totdeauna distincte, posibil din cauza creşterii slabe a organismului (talie redusă pentru o longevitate destul de mare).

La anure se pot face secţiuni prin oasele degetelor sau ale mandibulei. Oasele sînt în prealabil decalcifiate cu o soluţie de acid azotic 5%, spălate apoi 12 ore cu apă de robinet şi colorate cu hematoxilină Ehrlich. După spălare sînt incluse în glicerină. Vîrsta animalelor adulte se stabileşte după formula $A = n + 2$, în care n reprezintă numărul inelelor complete ce se observă pe secţiune, iar cifra 2 rezultă din reabsorbirea inelelor timpurii (ce corespund primelor 2 iernări) la adulţi.

Folosirea taliei în scopul determinării vîrstei nu este corespunzătoare, deoarece nu totdeauna vîrsta corespunde cu talia, aparînd diferenţe uneori de talie la aceeaşi vîrstă între populaţii cu origine diferită.

5.2.3. METODE DE DETERMINAREA VÎRSTEI LA REPTILE

Structura unor populaţii de reptile se poate analiza în cele mai bune condiţii prin marcare (amputare de degete, aplicare de inele şi recapturare), permiţînd cunoaşterea vîrstei animalelor marcate la naştere şi stabilirea de corelaţii între clasele de vîrstă şi talie. Pe baza acestei metode se poate studia structura unor populaţii cu reproducere continuă, observîndu-se comportamentul sau deplasările anumitor indivizi, procentul mortalităţii etc. Alte criterii de apreciere a vîrstei nu au aplicabilitate generală şi implică o bună cunoaştere a biologiei speciilor luate în studiu.

Estimarea vîrstei după talie s-a făcut la animale marcate, eliberate în natură, recapturate şi măsurate la intervale variate. Creşterea este la început rapidă, încetinindu-se mult după atingerea maturităţii sexuale. Diferenţele individuale însă sînt adesea considerabile, în corelaţie cu temperatura şi cu cantitatea de hrană disponibilă. Acest lucru este evident mai ales la şerpii tereştri şi mai puţin la şopîrle, care consumă prăzi de dimensiuni mai mici. Se pot observa de asemenea diferenţe de creştere legate de sex, fie încetinindu-se mai devreme la masculi *(Natrix)* sau la femele *(Elaphe)*. Intervenind variaţiile individuale, talia reptilelor nu furnizează decît indicaţii aproximative asupra vîrstei. Se poate aplica la speciile care au o scurtă perioadă de reproducere pe an şi ating maturitatea sexuală înainte de 3 ani (unii şerpi, şopîrle, ţestoase). Pe baza acestui criteriu se pot deosebi mai multe clase de vîrstă, doar grupul adulţilor de talie mare fiind heterogen.

Maturitatea sexuală poate fi utilizată pentru deosebirea adulţilor de imaturi deşi pot apare interpretări variate. La femele se ia în consideraţie prezenţa ouălor în oviducte sau a foliculilor ovarieni mari în ovare, dar la mascul pot apare unele interpretări eronate. Numeroase specii de ţestoase şi de şerpi din regiunile temperate au o spermatogeneză estivală, în timp ce prima acuplare nu se produce decît în primăvara următoare. Se recomandă drept criteriu al maturităţii sexuale data primei acuplări fecunde (atît la mascul cît şi la femelă). Maturitatea

sexuală este în general mai precoce la speciile mai mici, care trăiesc în zone mai calde. Este un caracter specific, ce trebuie utilizat cu prudență.

Inelele de creștere anuale se pot folsi la speciile unde creșterea se oprește în timpul iernii sau a sezonului uscat.

La țestoase se folosesc striurile concentrice de creștere, vizibile pe plăcile epidermice ale carapacei. Puii la eclozare au plăci netede sau lipsite de aceste striuri, care încep să apară din vara următoare, creșterea avînd loc în jurul plăcii inițiale. La indivizii mai în vîrstă, pe măsura uzurii superficiale a carapacei se șterg progresiv striurile inițiale, metoda devenind impracticabilă la femelele de peste 13 ani. La nivelul oaselor se observă semne ale creșterii ciclice. Pe secțiuni se observă alternarea a două tipuri de depozite ososase : o depozitare rapidă de os bogat vascularizat, în corelație cu o activitate metabolică crescută (zone) și o depunere lentă de os lamelar (annuli). Astfel de inele se întîlnesc la șerpi, șopîrle, crocodili și țestoase. Se pot face secțiuni prin falange (ca la amfibieni) sau prin alte oase (femur, humerus, coaste).

Observațiile se fac la binocular pe lame ososase subțiri nedecalcifiate în lumină naturală directă, reflectată sau polarizată (articularul la viperă) ; pe secțiuni de 30—40 mu decalcifiate cu acid azotic 5% și colorate cu hematoxilină Ehrlich ; pe microradiografii. La crocodili, deasupra fiecărui annulus se găsește cîte o linie de oprire a creșterii, cu afinitate pentru hematoxilină.

Factorii care determină formarea zonelor și a annulilor au un caracter esențial endogen (ritmuri biologice de creștere programate genetic). Alte ritmuri biologice endogene (sexuale) și exogene ar fi sincronizatoare ale creșterii, punînd-o în corelație cu condițiile sezoniere de mediu.

5.2.4. METODE DE DETERMINAREA VIRSTEI LA PASARI

La acest grup de vertebrate separarea diferitelor clase de vîrstă este destul de dificilă. Criteriile care pot fi folosite sînt numeroase și este bine să fie folosite mai multe odată pentru a aduce date mai precise asupra structurii demografice a unei populații de păsări.

Pentru aprecierea vîrstei la păsări pe viu, de o mare importanță este penajul. La multe specii de paseriforme, caradriiforme și falconiforme penajul juvenil este deosebit : pătat, vărgat, mărginit de culori deschise. Culoarea de ansamblu sau repartiția culorilor pe una, mai multe, sau pe toate penele poate servi la determinarea vîrstei. La găinușa de baltă *(Gallinula chloropus)* se deosebește culoarea capului la tînăr față de adult. La adult ciocul este scurt, cu baza roșie și vîrful galben, capul fiind cenușiu-albăstrui, iar la tînăr doar partea superioară a capului este închisă la culoare, placa frontală avînd o culoare galben-brun-verzuie (fig. 152). Țesătura penelor juvenile este particulară. Barbulele sînt puțin dense și abea ancorate, rezultînd o mare fragilitate, care se simte mai ales la rectricele externe și mediane, remigele secundare externe și mediane, remigele secundare interne, tectricele supraalare, etc.

Forma unor pene se poate adăuga criteriului de mai sus, în special a remigelor (cu excepția celei externe) și a rectricelor. Forma remigelor diferă la tineri față de adulți la potîrniche (fig. 153), iar a rectricelor la prigorie. Adultul de prigorie are rectricele mijlocii ascuțite și mai lungi

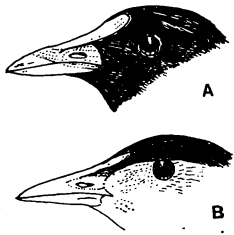


Fig. 152. Gallinula chloropus (găinușa de baltă) : A. — cap de adult ; B. — cap de tînăr.

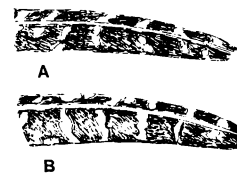


Fig. 153. Prima și a doua remige primară la potîrniche : A. — sub un an ; B. — peste un an.

cu 1—3 cm decît vîrful cozii, pe cînd juvenilii au rectricele mediane egale cu celelalte (fig. 154).

Vîrsta poate fi recunoscută un timp mai lung la speciile cu una sau mai multe năpîrliri parțiale succesive și cu pene juvenile tipice (un an la paserforme, 4 ani la laride).

Ciocul prezintă anumite variații legate de vîrstă. Lungimea sa definitivă este atinsă după un anumit timp. S-a folosit pentru apre-

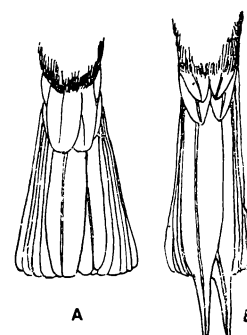


Fig. 154. Merops apiaster (prigorie) : A. coada de juvenil (dorsal); B. coada de adult (dorsal).

cierea vîrstei la *Alcedo atthis, Tetrao urogallus* și specii de limicole (fig. 155). Culoarea ciocului poate suferi schimbări legate de vîrstă. La *Turdus merula,* mascul, ciocul este brun închis la juvenili și galben portocaliu la imaturi și adulți.

La numeroase privighetori *(Acrocephalus, Locustella, Hypolais)* există în stadiul juvenil și imatur pete linguale negricioase (2—3) care

Fig. 155. Determinarea vîrstei cocoșului de munte după forma ciocului.

persistă de toamna pînă primăvara următoare. Ceroma de la baza ciocului răpitoarelor își poate schimba culoarea în funcție de vîrstă, trecînd de la cenușiu-albăstrui la juvenili la galben auriu la păsările mai vîrstnice.

Pierderea penelor în anumite regiuni poate servi drept criteriu de vîrstă la anumite specii. La *Corvus frugilegus* (cioara de semănătură) la adult dispar penele de pe față și de la baza ciocului, pe măsură ce pașărea utilizează ciocul la scormonit.

Culoarea irisului poate varia ca nuanță la juvenili, imaturi sau adulți și se poate folosi la anseriforme, falconiforme, columbiforme, cuculiforme, piciforme și pasceriforme.

Culoarea picioarelor la unele specii variază în funcție de vîrstă (ciconiifore, laride). La masculii unor galiforme vîrsta se poate aprecia după lungimea pintenului tarsal, ca la fazan. (fig. 156).

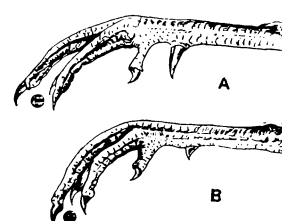


Fig. 156. Aprecierea vîrstei masculilor de fazan după pinten : A. cocoș bătrîn ; B. cocoș tînăr.

Bursa lui Fabricius — organ de tip limfo-epitelial, situat pe peretele dorsal al cloacei, poate fi folosită pentru aprecierea vîrstei la speciile unde este relativ mare și se deschide în cloacă (la fazan).

Organul de acuplare (penisul) poate fi folosit pentru deosebirea indivizilor tineri de adulți la anseriforme.

Osificația craniului, ce progresează cu vîrsta, ar putea fi folosită la paseriforme, lariforme, falconiforme. Păsările imature prezintă la craniu ferestre, ale căror suprafețe se vor reduce progresiv dinapoi înainte. Craniul la păsările juvenile apare roz uniform, iar la adulți albicios, fin punctat.

Mărcile scheletice sînt mai greu de utilizat datorită particularităților histo-fiziologice ale țesutului lor osos. La păsări înlocuirea osului primar cu creștere periodică prin osteoane secundare (substituție haversiană) este foarte intensă. Dacă se produce remanierea în toată grosimea oaselor (adesea în cazul diafizelor oaselor lungi) nu se vor mai observa semne de creștere. Regiunile osoase cu o substituție mai slabă (ca partea postero-ventrală a mandibulei) sînt mai potrivite pentru studii practice asupra vîrstei. Ca și la reptile, se constată și la păsări o mare variabilitate individuală, care limitează folosirea anumitor metode. De aceea pentru a stabili cu precizie longevitatea păsărilor este necesar să se aplice inelarea sau marcarea (la cuib în cazul speciilor nidicole sau în primele zile după naștere în cazul celor nidifuge).

5.2.5. METODE DE DETERMINAREA VÎRSTEI LA MAMIFERE

Metodele de determinarea vîrstei au fost mai bine puse la punct la diferite grupe de mamifere, valoarea multora dintre acestea fiind confirmată pe animale martor de vîrstă cunoscută. Față de poikiloterme, mamiferele prezintă avantajul de a avea o variabilitate individuală mult mai mică și de a avea o viteză de creștere mult mai puțin influențată de condițiile de mediu.

Dintre criteriile externe, pentru aprecierea vîrstei se poate folosi talia și greutatea. La mamifere în general pe măsura înaintării în vîrstă se modifică proporțiile relative ale corpului, capului, membrelor și adesea chiar structura și culoarea blănii. Pentru multe specii de ungulate se pot stabili categorii arbitrare de vîrstă, ușor de recunoscut în natură, care pot deveni absolute prin comparație cu indivizii marcați.

Inelele de pe coarne pot fi folosite cu succes pentru aprecierea vîrstei la bovine. Învelișul cheratinos al cornului nu crește cu o viteză constantă, ci uneori încetinită, în cazul unor restricții alimentare sau sub acțiunea unor factori endogeni. Astfel pe suprafața sa apar striuri de creștere, care la speciile din regiunile temperate apar cu o periodicitate anuală formînd inele (muflon, fig. 157).

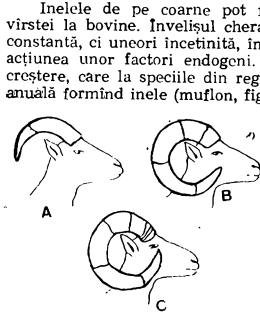


Fig. 157. Determinarea vîrstei **muflonului** după inelele anuale de pe coarne : A. coarne la un individ de 1 1/2 ani ; B. coarne de la un individ de 4 1/2 ani ; C. coarne la vîrsta de 8 ani.

Aspectul craniului poate servi pentru determinarea vîrstei la rozătoare. La muride suturile craniene nu sînt bine închise la indivizii tineri, iar la spalacide apar diferențe în gradul de dezvoltare al crestelor craniene (proeminente la adulți, ușor indicate la subadulți, absente la juvenili).

Mandibula (regiunea sa postero-ventrală) se poate folosi la insectivore, lagomorfe, rozătoare, carnivore și primate. Nu se poate întrebuința la speciile mari, unde substituția haversiană este prea intensă.

Dimensiunea cilindrului frontal poate servi pentru aprecierea vîrstei la cervide (fig. 158).

Dentiția de asemenea poate constitui un criteriu important în determinarea vîrstei.

a) Gradul de uzură al molarilor superiori este folosit la rozătoare (Spalacidae, Muridae). La muride după acest criteriu se pot stabili practic 3 grupe de vîrstă : grupa I — juvenili, cu dinții intacți, iar al 3-lea molar lipsă sau erupt, cu slabe urme de uzură ; grupa II — subadulți, cu urme de uzură pe al 3-lea și al 2-lea molar ; grupa III — adulți, cu urme de uzură pe toți molarii sau chiar cu molari foarte tociți.

b) Gradul de uzură al dinților inferiori este semnificativ la artiodactile (Cervidae, fig. 159).

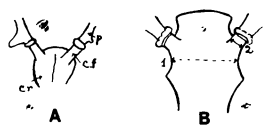


Fig. 158. Cervus elaphus (cerbul carpatin) : A — părțile coarnelor la cerb ; cf — cilindrul frontal ; cr — craniu ; p — prăjină ; B — măsurarea cilindrului frontal după metoda Harke : 1 — lungimea cilindrului frontal ; 2 — diametrul cilindrului frontal.

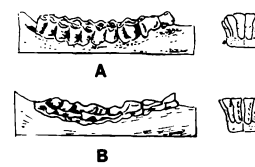


Fig. 159. Dentiția maxilarului inferior la căprior : A — 2 ani și 3 luni ; B — 8 ani.

c) Lungimea rădăcinii primului molar inferior, la rozătoare (Microtidae) poate să fie un indiciu de apreciere ;

d) Lungimea diastemei, de asemenea, se folosește la unele rozătoare (Microtidae, Spalacidae) ;

e) Stadiul dezvoltării dentiției și aspectul colților, la mascul, este folosit la speciile de porci mistreți (fig. 160). După ce dentiția devine completă (la doi ani și 3 luni) vîrsta se poate aprecia la mascul după aspectul caninilor inferiori, pe baza formulei $F = \frac{a}{b}$ (a = diametrul la baza craniului ; b = diametrul înaintea porțiunii tocite, F = coeficientul de formă al colțului).

f) Mărcile de la nivelul dentinei (pe secțiuni șlefuite) se aplică la pinipede, cetacee (Odontoceti) și carnivore.

La cerbi, dentina primei perechi de incisivi se depune sub formă de inele începînd cu al 4-lea an de viață. Numărînd inelele (+3) aflăm vîrsta animalului.

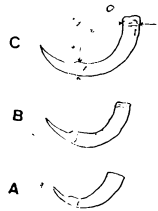


Fig. 160. Vîrsta la mistreț după dentiție: A. canin de pe mandibulă la un mascul de 1 1/2 ani; B. canin de pe mandibulă la un vier de 4 ani; C. canin la un vier de peste 6 ani.

g) Cementul circum sau interradicular (canini, molar 2 sau 3) dă rezultate foarte bune la artiodactile, carnivore, rozătoare, primate. Se recomandă folosirea acestui criteriu la animale de talie mare.

Oasele lungi pot constitui un criteriu în aprecierea vîrstei în cazul rozătoarelor. După decalcificarea lor cu acid. azotic 5% se fac secțiuni.

Osul penian avînd o creștere constantă în lungime, grosime și greutate, are semnificație în aprecierea vîrstei masculilor unor mamifere carnivore (Canidae, Mustelidae).

Proeminența osoasă de pe radius — situată la iepure la o distanță de 1—1,3 cm de articulația sa cu laba — constituie un alt indiciu referitor la vîrstă. La animalul tînăr are mărimea unui bob de grîu și se poate simți la pipăit; la iepurii peste un an aceasta nu se mai simte la pipăit (fig. 161).

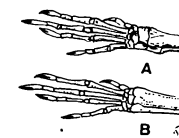


Fig. 161. Stabilirea vîrstei la iepure după proeminența de pe membrul anterior: A — iepure sub 9—10 luni; B — iepure de peste 10 luni.

Greutatea cristalinului crește proporțional cu vîrsta la carnivore și rozătoare, fapt pentru care are o importanță deosebită în stabilirea vîrstei acestor mamifere. Recent s-a propus pentru estimarea vîrstei o tehnică biochimică pe baza dozării colorimetrice a tirozinei din cristalin, cu rezultate foarte bune la rozătoare.

5.3. DISECȚIA — METODĂ DE STUDIEREA ORGANIZAȚIEI INTERNE

Disecția la diferite specii de vertebrate este un mod eficient de cunoaștere a dispoziției organelor „in situ"; Este necesar să se realizeze atît în cadrul lucrărilor practice de zoologia vertebratelor cît și de anatomie comparată.

5.3.1. DISECȚIA LA PEȘTII OSOȘI (Clasa OSTEICHTHYES — Supraordinul TELEOSTEI)

Peștii osoși reprezintă majoritatea speciilor actuale ce populează rîurile, mările și oceanele. Au corpul protejat de un exoschelet constituit din solzi elasmoizi de origină dermică. Endoscheletul este ± osificat. Branhiile sînt acoperite de piesele operculare. Apendicii locomotori sînt înotătoarele perechi și neperechi. Inima este prevăzută cu un bulb aortic. Cele mai multe dintre specii posedă o vezică gazoasă. Reproducerea și dezvoltarea se petrec, de regulă în apă, fecundația fiind la marea majoritate a speciilor externă.

Tip reprezentativ — *Perca fluviatilis* (bibanul).

Este o specie de apă dulce cu corpul alungit, ușor comprimat lateral. Capul, corpul și coada sînt bine distincte. Limita dintre cap și trunchi este marcată de deschiderea branhială, iar cea dintre trunchi și coadă de orificiul anal. Gura cu poziție terminală poartă dinți puternici și numeroși ca la toți peștii răpitori. Ochii situați pe laturile capului sînt mari, turtiți și fără pleoape și glande anexe. Pe fața dorsală a capului, spre vîrful botului, se găsesc narinele. Trunchiul este acoperit de solzi ctenoizi. Pe laturile corpului se găsește linia laterală, organ principal de orientare al peștilor. Coada este alcătuită dintr-un peduncul caudal și înotătoarea propriu-zisă, de tip homocerc, cu cei doi lobi simetrici susținuți de raze dermice (lepidotrichii).

Înapoia operculelor se inseră cele două înotătoare pectorale iar ventral, cu poziție toracică, se găsesc situate înotătoarele ventrale. Înapoia acestora, spre partea posterioară a corpului, se inseră înotătoarea anală. Median și dorsal se găsesc două înotătoare dorsale apropiate, prima cu raze țepoase, a doua cu raze moi. Anterior înotătoarei anale, într-o invaginare comună, se găsesc 3 orificii : anal, genital și excretor.

Tehnica de lucru. Pentru studiul organizației interne se recomandă să se facă disecția pe pește proaspăt. Se ia peștele cu mîna stîngă iar cu foarfeca se face o incizie pe linia medio-ventrală, de la orificiul anal pînă la cap, tăind și centura scapulară. Nu se introduce foarfeca prea profund pentru a nu afecta organele interne. Se așează peștele pe latura dreaptă într-o tavă de disecție, cu fundul acoperit de un strat de ceară de albine în amestec cu parafină și smoală. Cu ajutorul acelor cu gămălie se fixează peștele de stratul de pe fundul vasului. Înainte de a deschide cavitatea corpului se secționează tegumentul de pe flancul expus și se înlătură pentru a scoate în evidență musculatura. Se observă că pe fiecare latură a corpului se întinde un mușchi lateral, de la cap pînă la coadă. Acesta este împărțit într-o parte dorsală mai îngustă și groasă și o parte ventrală mai lată și subțire de către un sept orizontal, situat puțin deasupra liniei laterale. Mușchii laterali sînt alcătuiți din benzi transversale numite miomere, al căror număr este egal cu cel al vertebrelor, separate de pereții conjunctivi numiți miosepte. Această musculatură laterală a corpului joacă rolul principal în mișcarea peștelui în apă. În afara acesteia mai există mușchi proprii înotătoarelor, ai maxilarelor și dinților faringieni.

Pentru a pune în evidență branhiile se îndepărtează operculele (fig. 162). Acestea sînt susținute de arcurile branhiale. Pentru deschiderea cavității abdominale se secționează peretele lateral al corpului,

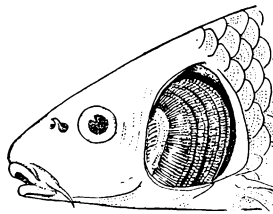


Fig. 162. Branhii la crap : observarea camerei branhiale după îndepărtarea operculului.

după o linie curbă, ce pornește de la orificiul anal în sus, apoi paralel cu coloana vertebrală pînă la opercul (fig. 163). Peretele secționat se înlătură pentru a pune în evidență organele interne.

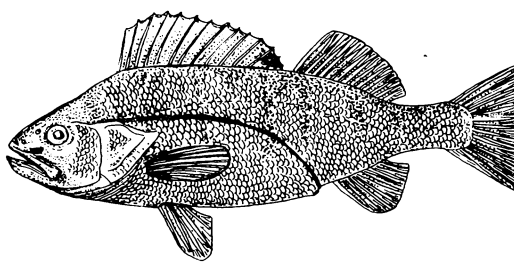


Fig. 163. Modul de secționare al peretelui lateral al corpului la biban *(Perca fluviatilis).*

5.3.1.1. Dispoziția generală a organelor interne

Cavitatea corpului este compărtimentată la pești de o diafragmă peritoneo-pericardiacă într-o cavitate cardiacă și o cavitate abdominală. Inima este situată în cavitatea cardiacă, ocupînd o poziție posterioară și ventrală față de branhii. Ea este învelită și protejată de pericard, o foiță subțire și transparentă.

În cavitatea abdominală se observă ficatul voluminos, ce acoperă o parte a tubului digestiv (stomac, apendici pilorici, anse intestinale)

(fig. 164). Între stomac și duoden se găsește situat pancreasul. În mezenterul intestinului se află splina, de formă alungită și de culoare roșie.

Sub coloana vertebrală se găsește vezica cu gaz, albă, sidefie, necompartimentată. Ea este un organ important hidrostatic. La biban, vezica cu gaz este puternic aderentă la musculatură, încît foarte uoșr se sparge

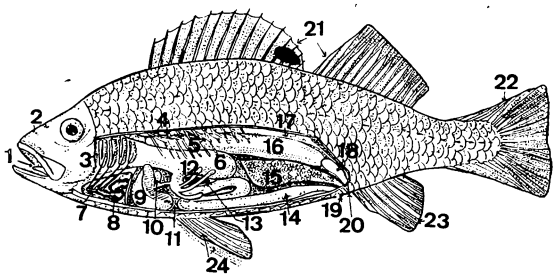


Fig. 164. Disecția la biban *(Perca fluviatilis)*: 1. limbă; 2. narine; 3. faringe și branhii; 4. vertebre; 5. coaste; 6. stomac; 7. aorta ventrală; 8. inima; 9. ficat; 10. vezica biliară; 11. colom; 12. cecumi pilorici; 13. splină; 14. intestin; 15. gonadă; 16. vezica cu gaz; 17. rinichi; 18. vezica urinară; 19. anus; 20. deschiderea uro-genitală; 21. înotătoarele dorsale; 22. înotătoarea caudală; 23. înotătoarea anală; 24. înotătoarea ventrală.

în timpul disecției. Între vezica cu gaz și tubul digestiv se observă organele genitale, a căror dezvoltare este în corelație cu anotimpul și cu virsta peștelui. Ovarele au forma unor saci alungiți, iar prin transparența peretelui ovarian se distinge conturul icrelor. Testiculele sau laptii, cu aspect de benzi de culoare albicioasă, se prind de vezica cu gaz printr-o lamă de țesut conjunctiv.

Într-un plan mai profund, sub coloana vertebrală, se întind pe toată lungimea trunchiului rinichii (mezonefrotici) ca două benzi roșii-brune. La biban se distinge și o vezică urinară.

5.3.1.2. Sisteme de organe

Sistemul digestiv. Este alcătuit din tubul digestiv și glandele anexe ale acestuia. Tubul digestiv începe cu cavitatea bucofaringiană, care este largă și prevăzută cu dinți, ce servesc la reținerea prăzii. Pe planșeul cavității bucale se găsește limba ce servește ca organ de gust și nu de masticație. Esofagul este scurt, dar larg și nu comunică cu vezica cu gaz. Stomacul este voluminos cu aspect de sac. Intestinul mediu formează mai multe anse susținute de mezenter. În partea sa anterioară, în duoden, se deschid 3 apendici pilorici, care măresc suprafața de absorbție și canalele glandelor anexe tubului digestiv. Intestinul posterior îl continuă pe cel mediu fără o delimitare vizibilă. El se deschide la exterior prin orificiul anal.

Glandele anexe tubului digestiv sînt ficatul și pancreasul. Ficatul voluminos, de culoare brun-roșcată este alcătuit din mai mulți lobi. Vezica biliară este prezentă. Are o formă sferică sau ovală și este de culoare verde. În ea se acumulează bila, secreție a ficatului. De la vezică pornește un scurt canal cistic care se unește cu canalul hepatic formînd canalul coledoc, ce se deschide în duoden, înapoia cecumilor pilorici. Pancreasul roz-gălbui este diseminat pe mezenter, în vecinătatea cecumilor pilorici și a anselor intestinale. Canalul pancreatic se deschide în urma canalului coledoc.

Prin desfășurarea tubului digestiv apare în întregime vezica cu gaz, unicamerală, plină cu un amestec de oxigen, gaz carbonic și azot. Rolul vezicii este complex : ca organ hidrostatic asigură menținerea corpului în poziție normală, ca organ receptor și amplificator de sunete funcționează ca o cutie de rezonanță.

Sistemul respirator. Este de tip branhial. Este alcătuit din 4 perechi de branhii susținute de primele 4 perechi de arcuri branhiale. Ele sînt situate în două cavități branhiale acoperite de piesele operculare. Pe fiecare arc branhial se prind 2 rînduri de lame cu lamele branhiale de culoare roșie, bine vascularizate deoarece la acest nivel are loc oxigenarea sîngelui.

De pe pereții arcurilor branhiale pornesc spini branhiali (branhiospini) cu rol de sită, servind la filtrarea apei și îndepărtarea particulelor de dimensiuni mai mari.

Sistemul circulator. Inima localizată în cavitatea cardiacă și învelită în pericard este alcătuită dintr-un atriu (de culoare vișinie) cu poziție dorsală și pereții mai subțiri și un ventricul (de culoare roșie) ventral și cu pereții mai groși. Atriul comunică cu un sinus venos în care se colectează sîngele carbonatat. În sinusul venos se deschid cele două canale Cuvier, cu dispoziție simetrică. Ventriculul se continuă cu un bulb aortic dezvoltat, cu pereții elastici. Acest bulb este dilatarea aortei ventrale, care duce sîngele de la inimă către branhii. De pe aorta ventrală pornesc arterele branhiale aferente, care transportă sîngele încărcat cu CO_2 la lamele branhiale unde se oxigenează. Sîngele oxigenat este transportat de arterele branhiale eferente în cele două rădăcini aortice care se unesc înapoia inimii într-o aortă dorsală ce se întinde pe sub coloana vertebrală. Aceasta dă ramificații la diferite organe (stomac, intestin, organele genitale și excretoare) distribuind sîngele oxigenat. La nivelul țesuturilor este cedat oxigenul și preluat dioxidul de carbon. Sîngele carbonatat este colectat de vena codală și de către venele cardinale anterioare și posterioare, care îl varsă în canalele Cuvier și acestea în sinusul venos.

Sistemul genital. Pe sub vezica gazoasă se întind gonadele (testiculele și ovarele). Acestea au conducte proprii de evacuare a produșilor sexuali, independente de cele urinare. Atît spermiductele cît și oviductele se unesc terminal într-un scurt conduct comun, ce se deschide la exterior prin orificiul genital, situat pe papila ano-genito-urinară.

Sistemul excretor. Este alcătuit din doi rinichi (de tip mezonefros) situați sub coloana vertebrală. Ei apar ca două benzi de culoare roșie-brună, ce se întind pe toată lungimea trunchiului, de o parte și de alta

a aortei dorsale. În partea lor anterioară cei doi rinichi se lățesc și se contopesc formînd rinichiul cefalic. Partea mijlocie a rinichiului, care constituie rinichiul troncal, păstrează aspectul de bandă cu marginile incizate. Caudal cei doi rinichi se îngustează, se contopesc parțial și se continuă cu ureterele subțiri și transparente. Cele două uretere se unesc într-un conduct comun, care se dilată constituind o „vezică urinară". Orificiul excretor se găsește în urma celui genital la nivelul papilei genito-urinare.

5.3.2. DISECȚIA LA AMFIBIENI (Clasa AMPHIBIA — Ordinul ANURA)

Clasa Amphibia face parte din Supraclasa Tetrapoda, vertebrate care au ca organe de mișcare membre perechi, podii sau chiridii. Din punct de vedere numeric reprezintă grupul cel mai mic de vertebrate. Sînt ca și peștii animale poikiloterme. Respirația branhială este obligatorie în stadiul larvar ; adulții au respirație pulmonară și tegumentară. De aceea tegumentul este nud, lipsit de fanere, bine vascularizat și umectat de secreția glandelor mucoase. Inima este tricamerală la adulții și bicamerală la larve. Circulația este dublă și incompletă. La majoritatea speciilor fecundația este externă, are loc în apă. Din ou iese o larvă, a cărei dezvoltare se continuă și se desăvîrșește prin metamorfoză.

Tip reprezentativ — *Rana ridibunda* (broasca de lac).

Rroasca de lac are corpul robust, turtit dorso-ventral, alcătuit din cap și trunchi, lipsit de coadă. Capul voluminos se prinde direct de trunchi, deoarece nu se diferențiază un gît. Gura are deschiderea largă iar pe maxilarul superior se găsesc dinți numeroși și mărunți. Pe laturile capului se găsesc ochii proeminenți, protejați de două pleoape și de o membrană nictitantă. Glandele lacrimale și Harder sînt prezente.

Pe fața superioară a capului, către vîrful botului, se găsesc nările, deschiderile sacilor olfactivi.

Înapoia ochilor se găsesc membranele timpanice (fig. 165), cu contur circular. Aceste membrane închid la exterior urechea medie, o achiziție nouă a organului auditiv al amfibienilor, ca adaptare la viața terestră.

La masculi, înapoia și sub comisura bucală se găsesc cei 2 saci vocali cu rol în amplificarea sunetelor emise. Membrele anterioare sînt

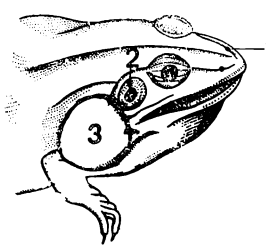


Fig. 165. Capul la mascul de broască de lac *(Rana ridibunda)* : 1. nări externe ; 2. membrana timpanică ; 3. sac rezonator.

scurte, slab dezvoltate, prevăzute cu 4 degete. Degetul intern al acestora prezintă la mascul, în perioada de reproducere, o umflătură la bază ca o perniță (caracter sexual secundar). Membrele anterioare servesc la susținerea corpului pe sol și ca frînă după un salt. Membrele posterioare mult mai dezvoltate ; sînt adaptate pentru înot și sărit. Ele sînt prevăzute cu 5 degete lungi, prinse într-o palmatură interdigitală. Tegumentul este nud, lipsit de fanere. Pe fața dorsală se disting mici verucozități datorită numeroaselor glande mucoase și seroase, a căror secreție are rol protector. Dorso-lateral se disting două creste glandulare. Tegumentul broaștei se mișcă ușor față de corp, datorită prezenței unui număr mare de saci limfatici.

Tehnica de lucru

Broasca se sacrifică prin spinalizare sau prin anestezie cu eter sau cloroform. După sacrificare se așează într-o tavă de disecție cu abdomenul în sus. Se fixează cu ace maxilarul superior și membrele în extensie. Înainte de a deschide cavitatea corpului se desprinde pielea pentru a pune în evidență musculatura. În acest scop se face o incizie în tegument pe linia mediană a feței ventrale a corpului, începînd de la orificiul cloacal pînă la mandibulă. Apoi se mai fac alte două tăieturi transversale, perpendiculare pe prima, ce se vor întinde și de-a lungul picioarelor (fig. 166). Cu pensa se prinde tegumentul și se des-

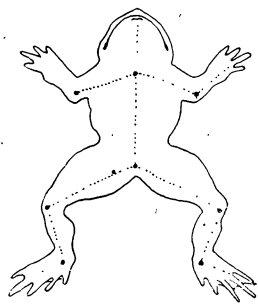


Fig. 166. Liniile de secționare a tegumentului la broasca de lac *(Rana ridibunda).*

prinde ușor de pe corp. Operația nu este dificilă deoarece la amfibieni nu aderă pe toată suprafața sa la mușchi, ci doar în anumite puncte. Ea rămîne separată de pătura de mușchi prin niște spații, sacii limfatici. Pe fața internă pielea este foarte bine vascularizată, deoarece îndeplinește și funcția respiratorie. Prin îndepărtarea pielii apare musculatura diferențiată în mușchi specializați pentru realizarea anumitor funcții. Ventral se observă mușchiul drept abdominal, de-o parte și de alta a liniei albe. Pe mijlocul acestui mușchi se întinde vena abdominală, care nu trebuie secționată în timpul disecției pentru a evita hemoragia. Pe laturile abdomenului se întind mușchii oblici externi, care prin contrac-

ție micșorează cavitatea abdominală. Anterior dreptului abdominal se găsește mușchiul pectoral, al cărui tendon se inseră pe humerus, fiind un adductor al brațului. Pe fața dorsală se disting : mușchiul dorsal care acoperă omoplatul, mușchiul latul dorsal, în formă de evantai care rotește brațul, mușchiul lungul dorsal care se întinde de-a lungul coloanei vertebrale, precum și alți mușchi mai mici și mai puțin evidenți. La cap sînt dezvoltați mușchi de coborîre și de ridicare ai mandibulei. Este de asemenea bine dezvoltată musculatura picioarelor posterioare.

Pentru deschiderea cavității corpului se taie cu un foarfece peretele muscular ventral, pe linia mediană, de la orificiul cloacal pînă la mandibulă. Se taie cu grijă centura scapulară pentru a nu atinge inima. Pereții laterali ai cavității abdominale se răsfrîng de-o parte și de alta a corpului și se fixează cu ace de substratul tăvii de disecție. Preparatul se spală cu apă și tot sub apă se observă organizația internă.

5.3.2.1. Dispoziția generală a organelor interne

În partea anterioară a cavității viscerale se observă inima tricamerală, alcătuită din două atrii inegale cu pereții subțiri, de un roșu mai închis și un ventricul cu pereții groși, de culoare roz. Pe laturile inimii sînt situați plămînii cu pereți subțiri și transparenți, vascularizați și de culoare gri-roză. Ei pot fi observați bine cînd se mențin plini de aer, dar în general se strîng la atingere în timpul disecției. Sub inimă se întinde ficatul voluminos, alcătuit din trei lobi și prevăzut cu o vezică biliară rotundă, de culoare verde închis. Pe partea stîngă, acoperit în mare parte de ficat, este stomacul, care se continuă cu intestinul. Între stomac și duoden, la partea anterioară a intestinului, pe mezenter, este situat pancreasul, cu aspect roz-gălbui. Rectumul apare ca o dilatare a părții posterioare a intestinului iar anterior lui, pe mezenter, se distinge splina de culoare vișinie. Deasupra rectumului este situată vezica urinară bilobată cu pereții transparenți (fig. 167). În partea dorsală a cavității abdominale se află rinichii de culoare roșie-brună, pe a căror față ventrală se găsesc glandele suprarenale, de un galben portocaliu. Aceștia sînt acoperiți de intestin și de ovare, la femelă, care în perioada de reproducere devin foarte voluminoase, ocupînd o mare parte a cavității abdominale. Pe laturile ovarelor se observă oviductele răsucite și cu pereții transparenți. La mascul, sub intestin, se găsesc două testicule cu contur oval, de culoare portocalie.

5.3.2.2. Sisteme de organe

Sistemul digestiv. Este mai bine diferențiat decît la pești. Cavitatea buco-faringiană, delimitată de cele două maxilare, este largă. Dinții sînt prezenți doar pe maxilarul superior. Limba musculoasă se prinde cu marginea anterioară de simfiza mandibulară. Extremitatea posterioară a limbii este bilobată și poate fi proiectată mult în afară, servind la prinderea insectelor. Pe plafonul cavității, în vecinătatea oaselor vomeriene se află coanele, prin care sacii olfactivi comunică cu cavitatea buco-faringiană. Tot pe plafonul cavității bucale, pe linia de articulație a celor două maxilare se găsesc cele două orificii ale trompelor lui Eustache, ce fac legătura cu urechea medie. Către fundul cavității buco-faringiene,

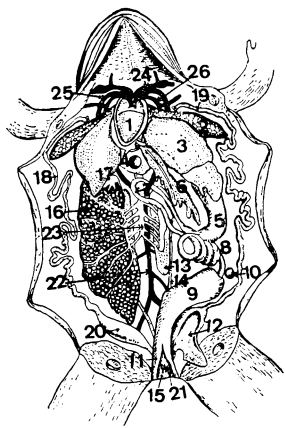


Fig. 167. Disecția la broasca de lac *(Rana ridibunda)*: 1. inima; 2 plămîn; 3. ficat; 4. vezica biliară; 5. stomac; 6. pancreas; 7 duoden; 8. intestin subțire; 9. rectum; 10. splină; 11. cloaca (deschisă); 12. vezica urinară; 13. rinichi; 14. ureter; 15. deschiderile ureterelor în cloacă; 16. ovarul drept; 17 corp adipos; 18. oviductul drept; 19. oviductul sting; 20. uter (ovisac); 21. papile uterine; 22. aorta dorsală; 23 vena cavă posterioară; 24. artera carotidă comună; 25. cîrja aortică stîngă; 26. artera pulmo-cutanee.

pe o papilă situată la partea posterioară a limbii, se găsește orificiul camerei laringo-traheene. Posterior acestui orificiu glotic este deschiderea esofagiană cu aspect de fantă orizontală. Pe părțile latero-superioare ale planșeului bucal se găsesc, la masculi, deschiderile sacilor vocali (rezonatori (fig. 168).

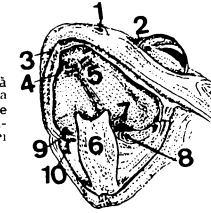


Fig. 168. Cavitatea bucală la masculul de broască de lac *(Rana ridibunda)*: 1. nări externe; 2. pleoapa superioară; 3. dinți maxilari; 4. nări interne (coane); 5. dinți vomerieni; 6. limbă; 7. deschiderea esofagului; 8. glotă; 9. deschilerea trompei lui Eustache; 10. deschiderea sacului vocal.

Fundul cavității buco-faringiene se continuă cu esofagul, care este scurt și larg, de culoare mai deschisă decît restul tubului digestiv.

Stomacul este situat pe partea stîngă a cavității corpului. Este alungit și curbat. La limita dintre stomac și intestin există o strangulare (sfincter) numită pilor. Intestinul este relativ scurt. Prima parte a in-

testinului subțire formează ansa duodenală, în care se deschid conductele anexe tubului digestiv. Intestinul subțire, care formează cîteva anse fixate prin mezenter, se continuă cu intestinul gros, fără a exista o delimitare netă între ele. Ultima parte a intestinului gros, dilatată, rectumul se deschide în cloacă.

Glandele anexe tubului digestiv sînt ficatul și pancreasul.

Ficatul este voluminos, alcătuit din 3 lobi : drept, stîng și median. Culoarea lui este brun-roșcată. De la ficat pornesc canalele hepatice ce transportă bila către vezica biliară. De la vezica biliară pornește un canal cistic scurt, care se unește cu canalul hepatic drept formînd un canal de calibru mai mare, canalul coledoc. Acesta străbate pancreasul, pe toată lungimea lui, apoi se unește cu canalul pancreatic formînd canalul pancreatico-coledoc, ce se deschide în duoden. Aceste canale pot fi ușor puse în evidență prin compresarea vezicii biliare ; prin împingerea bilei pe traseul acestor canale ele se colorează în verde închis.

Pancreasul este o glandă compactă, alungită, de culoare gălbuie. Așa cum s-a arătat, canalul pancreatic se unește cu canalul coledoc alcătuind canalul pancreatico-coledoc.

Sistemul respirator. Este alcătuit, la adult, din căile aeriene, puțin dezvoltate și plămîni. Căile aeriene încep cu narinele, deschiderile externe ale sacilor olfactivi, se continuă cu fosele nazale, coanele, cavitatea buco-faringiană și se termină cu camera laringo-traheană, care comunică cu plămînii prin două orificii. Plămînii au forma unor saci alungiți cu pereții subțiri, transparenți, extensibili, bine vascularizați. Suprafața lor externă este netedă, iar cea internă este cutată.

Sistemul circulator. Organul principal al acestui sistem este inima, situată în partea cranială a cavității viscerale, învelită de un pericard subțire și transparent. Inima prezintă două atrii inegale, cel drept fiind mai voluminos prin încorporarea sinusului venos și un ventricul cu pereții groși, de la care pleacă un con arterial care se prelungește cu un trunchi aortic scurt. Acesta se împarte în două ramuri simetrice, din care pornesc 3 perechi de artere ce irigă întregul organism : arterele carotide ce duc sîngele oxigenat la cap, cîrjele aortice ce transportă sînge amestecat în tot restul corpului și arterele pulmo-cutanee care duc sîngele la organele respiratorii (plămîni și tegument) pentru oxigenare. Sîngele carbonatat este colectat din corp și readus la inimă, în atriul drept de venele cave anterioare (craniale) și vena cavă posterioară (caudală). Sîngele oxigenat la nivelul plămînilor este adus la inimă, în atriul stîng, de două vene pulmonare.

Sistemul excretor. Cei doi rinichi (de tip mezonefros) sînt alungiți, comprimați dorso-ventral și situați în cavitatea abdominală de o parte și de alta a coloanei vertebrale și a aortei abdominale. Pe suprafața lor ventrală se observă glandele suprarenale de forma a două benzi portocalii. De pe latura externă a fiecărui rinichi pornește ureterul cu peretele subțire și transparent. Cele două uretere se apropie median și se deschid în cloacă, în peretele dorsal al acesteia. La mascul, unde nu există gonoducte, ureterele devin conducte urospermatice, îndeplinind atît funcție urinară cît și genitală. Pe peretele ventral al cloacei se deschide vezica urinară, voluminoasă și bilobată.

Sistemul genital. La mascul acesta este alcătuit din două testicule sferice sau uşor ovale, de culoare galbenă, situate pe partea ventrală şi anterioară a rinichilor. Ele se fixează la acest nivel printr-un mezenter special numit mezorchium. Anterior testiculelor se află corpii adiposi, puternic franjurați, cu rol trofic. De la testicule pornesc o serie de canalicule eferente, fine, care pătrund în rinichi. Prin aceste canalicule eferente extra şi intrarenale sperma este transportată către canalul urospermatic situat pe marginea externă a rinichiului.

La femelă, ovarele au forma unor saci cu pereții subțiri şi transparenți. Ele sînt fixate printr-un mezovarium de fața ventrală a rinichilor. Prin transparența pereților ovarieni se văd ovulele pigmentate neuniform. Medial şi superior, fiecare ovar prezintă un corp adipos cu aceeaşi înfățişare şi funcție ca şi la mascul. Lateral față de ovare se întind oviductele, lungi şi întortocheate. Ele se deschid în cavitatea generală a corpului prin pîlnii mici (pavilioane ciliate) în apropiere de pericard. În partea sa terminală, oviductul se dilată formînd uterul, ai cărui pereți rămîn subțiri şi transparenți. Cele două utere se deschid în vîrful cîte unei papile uterine (mai pigmentată), pe peretele dorsal al cloacului, anterior deschiderilor urinare.

5.3.3. DISECȚIA LA REPTILE (Clasa REPTILIA — Ordinul SQUAMATA)

Reptilele sînt tetrapode adaptate complet la viața terestră, care spre deosebire de amfibieni nu mai revin la mediul acvatic pentru reproducere. Tegumentul lor, cu puține glande, prezintă epiderma puternic cornificată ce formează solzi sau plăci cornoase, cu rol protector. Respirația este pulmonară, inclusiv la speciile adaptate secundar la viața acvatică. Inima este tricamerală la majoritatea reprezentanților, cu excepția crocodilienilor, la care este tetracamerală. Fecundația este internă, masculii au organe de acuplare. Ouăle sînt mari, bogate în vitelus (telolecite). Dezvoltarea embrionară are loc în ou, în afara apei. În cursul dezvoltării embrionare apar foițele embrionare anexe, amniosul şi alantoida cu rol în protecție, respirație şi excreție (vertebrate amniote). Ca şi peştii şi amfibienii sînt vertebrate poikiloterme, sensibile la temperatura mediului ambiant.

Tip reprezentativ — *Lacerta agilis* (şopîrla cenuşie)

Corpul şopîrlei este diferențiat în cap, gît, trunchi şi coadă şi este acoperit de solzi epidermici.

Forma solzilor variază chiar la acelaşi animal în diferite regiuni ale corpului. Suprafața dorsală a capului este acoperită de plăci cornoase al căror număr şi poziție constituie un criteriu taxonomic. Către vîrful botului, tot pe fața dorsală a capului, se găsesc nările. Lateral sînt plasați ochii protejați de două pleoape şi o membrană nictitantă (fig. 169). La partea posterioară a capului se află deschiderile auditive cu membranele timpanice situate mai în profunzimea acestora. Trunchiul alungit este acoperit pe spate de solzi mărunți, iar pe partea ventrală de solzi mai mari dispuşi în şiruri longitudinale. În dreptul gîtului solzii formează un guleraş festonat. La limita dintre trunchi şi coadă se găseşte orificiul cloacal, o fantă transversală. Coada este lungă, cilindrică şi aco-

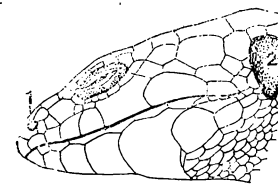


Fig. 169. Cap de șopîrlă văzut din profil : 1. narine ; 2. mebrana timpanică.

perită de solzi dispuși în verticile. Membrele sînt bine dezvoltate terminate cu 5 degete și prevăzute cu gheare. Pe fața internă a coapselor se găsesc porii femurali.

Tehnica de lucru

Se sacrifică animalul prin narcotizare cu cloroform sau eter etilic. După sacrificare se așează animalul cu abdomenul în sus. Se fixează membrele cu ace și se secționează tegumentul medio-ventral, de la cloacă pînă la mandibulă. La nivelul membrelor se fac secțiuni transversale pe prima. Tegumentul se răsfrînge lateral și se fixează cu bolduri, scoțîndu-se în evidență musculatura ventrală. Se taie apoi peretele muscular al corpului, pe aceeași linie de disecție. Se secționează cu atenție centura pelviană și scapulară. Se răsfrîng pe laturi lambourile musculare punîndu-se în evidență organizația internă a șopîrlei.

5.3.3.1. Dispoziția generală a organelor interne

În cavitatea toracică, în dreptul membrelor anterioare ,se găsește inima, iar anterior ei se distinge traheea prevăzută cu inele cartilaginoase. Pe sub trahee se întinde esofagul. Pe părțile latero-inferioare ale inimii sînt situați plămînii de forma unor saci alungiți (fig. 170). Ficatul ocupă aproape toată partea anterioară a cavității abdominale, fiind voluminos și format din mai mulți lobi. Pe fața ventrală a ficatului se observă vezica biliară. Ficatul maschează aproape complet stomacul, care se continuă cu intestinul. Acesta descrie cîteva anse și se deschide în cloacă. Între stomac și duoden este pancreasul alungit și compact. Tot în vecinătatea duodenului se găsește splina, mică și de culoare roșie. Sub intestin, anterior și ventral față de rinichi, sînt situate gonadele ușor asimetrice. La masculi există două testicule ovoide alb-gălbui, de la care pornesc canalele deferente ce se deschid în cloacă. La femelă, ovarele au aspect de ciorchine și sînt fixate de mezenter. Oviductele, cu dispoziție laterală față de ovare, au pereții transparenți. Se deschid în cloacă pe peretele dorsal. Posterior și dorsal gonadelor se găsesc rinichii lobați, de culoare vișinie.

5.3.3.2. Sisteme de organe

Sistemul digestiv. Începe cu cavitatea bucală cu dinți mărunți și numeroși pe cele două maxilare. Limba este subțire bifidă și mobilă. Pe plafonul cavității bucale se găsesc coanele. Urmează un faringe scurt

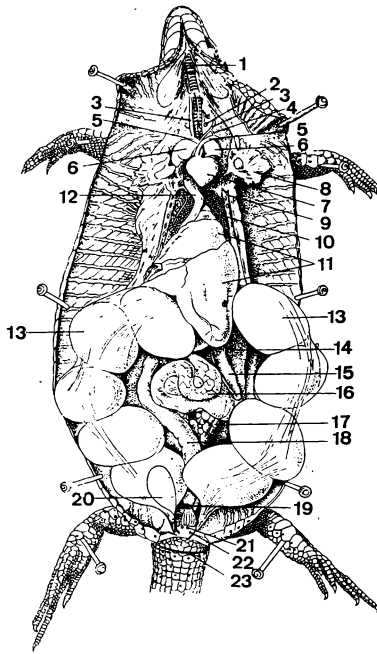


Fig. 170. Disecția la femela de șopîrlă cenușie (*Lacerta agilis*): 1. trahee; 2. timus; 3. artere carotide; 4. canal carotidian; 5. cîrje aortice (dreaptă și stîngă); 6 atrii (drept și stîng); 7 ventricul; 8. pîlnia oviductului; 9. oviduct; 10. plămîn; 11. ficat; 12. vena suprahepatică; 13. ouă; 14. stomac; 15. pancreas; 16. intestinul subțire; 17. ovar; 18 intestinul gros; 19. deschiderea rectului; 20 vezica urinară; 21. orificiul ureterelor; 22. orificiul oviductelor; 23 deschiderea cloacală.

în care se deschid trompele lui Eustache. Esofagul este lung, îngust și dilatabil. Stomacul este alungit și se continuă cu intestinul subțire. În prima ansă intestinală sau duoden se deschid conductele glandelor digestive, anexe tubului digestiv. Intestinul subțire descrie cîteva anse, prinse în mezenter, și se continuă cu intestinul gros. Ultima parte a intestinului gros, rectumul, se deschide în cloacă ce comunică cu exteriorul prin orificiul cloacal.

Ficatul voluminos și lobat, cu vezica biliară situată pe fața ventrală, varsă bila în duoden prin canalul coledoc, după ce acesta străbate pancreasul.

Sistemul circulator. Inima, situată ventral și anterior, în cavitatea corpului, este alcătuită din două atrii și un ventricul. Caracteristic pentru inima de șopîrlă este prezența unui perete interventricular incomplet. Sinusul venos este încorporat de atriul drept, care primește sîngele carbonat din corp prin venele cave anterioare și posterioară. De la ventricul, compartimentat incomplet de septul interventricular, pleacă din partea dreaptă trunchiul pulmonar (arterele pulmonare) ce duce sîngele carbonatat la plămîni pentru oxigenare și cele două cîrje aortice, stîngă și dreaptă, care se unesc înapoia inimii formînd aorta dorsală. Cîrja aortică stîngă pornește din partea mijlocie a ventriculului (unde se găsește sînge amestecat) iar cea dreaptă din partea stîngă a acestuia (cu sînge oxigenat). De pe acest arc aortic se desprind arterele carotide și subclaviculare care distribuie sînge oxigenat în partea anterioară a corpului.

Sistemul excretor. Rinichii, de tip metanefros, sînt situați în partea dorsală și posterioară a cavității abdominale. La șopîrlă rinichii sînt lobați. De pe marginea externă a rinichilor pornesc ureterele care se deschid în cloacă, pe peretele dorsal al acesteia. Pe peretele cloacal ventral se deschide vezica urinară, care la reptile nu mai este un diverticul cloacal, ci provine din alantoidă.

Sistemul genital. La mascul există două testicule ovoide situate la nivelul regiunii lombare, de o parte și de alta a coloanei vertebrale (fig. 171). Prin canalele eferente se leagă de epididim (rudiment al zonei mezonefrotice a rinichiului). Fiecare epididim se continuă cu canalul deferent (care provine din canalul Wolff). La mascul, orificiile genitale și urinare sînt foarte apropiate unele de altele încît se confundă, formînd orificii comune. Organul copulator este reprezentat de două formațiuni, hemipenisuri, care se pot devagina spre exterior prin orificiul cloacal. Ele sînt evaginări ale peretelui dorsal cloacal.

La femelă, ovarele au contur oval înainte de maturitate și formă de ciorchine în stadiul de adult. Ele sînt situate asimetric pe mezenter, ovarul drept fiind plasat mai sus decît cel stîng. Oviductele (canalele Müller) sînt lungi, cu pereții subțiri și pliați, ocupînd o poziție laterală față de ovare. Partea lor cranială în formă de pîlnie comunică cu cavitatea peritoneală. Posterior fiecare oviduct se lărgește într-un uter. Cele două oviducte se deschid pe peretele dorsal al cloacei prin orificii separate de cele urinare.

5.3.4. DISECȚIA LA PĂSĂRI (Clasa AVES, Ordinul COLUMBIFORMES)

Păsările sînt tetrapode amniote, homeoterme, avînd temperatura corpului constantă. Au membrele anterioare transformate în aripi, servind la zbor iar cele posterioare, ce susțin corpul, mai mult sau mai puțin modificate, asigură mersul pe uscat sau înotul.

Tegumentul este subțire și uscat fiind lipsit de glande. Există o singură pereche de glande la baza cozii, glandele uropigiene, a căror secreție grasă unge penele, menținîndu-le elastice și impermeabile pentru apă. Dintre producțiunile cornoase, cele mai importante ale tegumentului fac parte penele, care apără corpul de umezeală, de lovituri, de variațiile de temperatură și servesc la zbor.

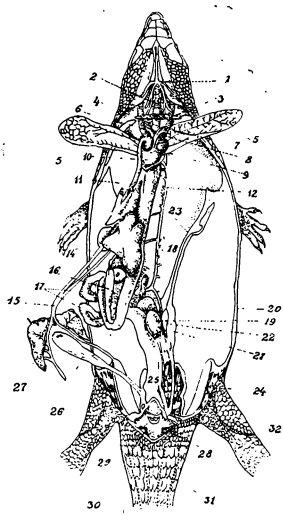


Fig. 171. Disecția la masculul de șopîrlă cenușie *(Lacerta agilis)*: 1. os hioid; 2. trahee; 3. tiroidă; 4. timus; 5. plămîn; 6. venă jugulară; 7. arteră carotidă; 8. arc aortic; 9. atriu; 10. ventricul; 11. vena hepatică; 12. aorta; 13. ficat; 14. vezica biliară; 15. artera mezenterică; 16. pancreas; 17. intestin; 18. splină; 19. testicul stîng; 20. testicul drept; 21. epididim; 22. suprarenale; 23. canalul lui Müller; 24. rinichi; 25. rect; 26. vezica urinară; 27. corp adipos; 28. cloacă; 29. orificiul urinar și genital masculi; 30. penis; 31. mușchii retractori ai penisului (puncțați, sub tegument); 32. pori femurali.

Sistemul respirator de tip pulmonar are o structură mult mai complicată decît la reptile. Inima este tetracamerală și păstrează numai cîrja aortică dreaptă. Fecundația este internă, dar masculii nu au organ de acuplare la toate speciile. Sînt vertebrate ovipare, ouăle sînt mari, bogate în vitelus (telolecite), protejate de o coajă calcaroasă. Ele sînt clocite de părinți.

5.3.4.1. Tip reprezentativ Columbia livia (porumbel)

Porumbelul are capul oval, ciocul mic și drept. Partea bazală a ciocului este acoperită de o ceromă, o membrană moale, pigmentată și bogată în corpusculi tactili. La baza ciocului, la nivelul ceromei, se găsesc nările înguste. Ochii sînt mari, protejați de două pleoape mobile și o membrană nictitantă transparentă. Înapoia ochiului se găsește orificiul conductului auditiv extern, puțin vizibil, fiind acoperit de pene modificate.

Gîtul este relativ lung și mobil iar corpul scurt, ovoid, terminat cu o coadă. La baza cozii, pe fața inferioară, se află orificiul cloacal, o

fantă transversală limitată de o proeminență tegumentară. Tot corpul (cu excepția ciocului și a membrelor posterioare) este acoperit de pene, care după structura, locul de inserție și rolul pe care îl au aparțin următoarelor categorii : pene de contur (remige, rectrice, tectrice), fulgi, puf, pene filiforme, pene modificate (ornamentale, cili, vibrise). Penele se inseră pe anumite zone ale corpului numite pterii, mărginit de zone golașe-apterii. Aripile sînt mari și ascuțite asigurînd un zbor rapid. Picioarele sînt scurte și terminate cu 4 degete prevăzute cu gheare, dintre care primul orientat posterior iar celelalte trei orientate anterior. Fața plantară a degetelor este acoperită cu scuturi cornoase.

Tehnica de lucru

Se sacrifică porumbelul prin cloroformizare și apoi se fixează pe o tavă de disecție cu abdomenul în sus. Aripile se întind pe laturi iar picioarele se extind înapoi și puțin lateral. Se zmulg penele de pe fața ventrală a trunchiului și gîtului (exceptînd coada și aripile). Se taie cu o foarfecă tegumentul pe linia medio-ventrală, de la orificiul cloacal pînă la baza ciocului. Se mai fac încă două tăieturi transversale pe prima ; una în dreptul aripilor, alta în dreptul membrelor posterioare (fig. 172). Se desprinde cu grijă pielea, mai ales pe partea ventrală

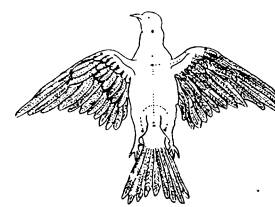


Fig. 172. Liniile de secționare a tegumentului pentru disecția la porumbel.

a gîtului pentru a nu rupe gușa, care este subțire și aderentă. Se îndepărtează lateral lambourile de piele și se fixează cu ace. Se observă musculatura ventrală care poartă amprenta unei adaptări profunde la zbor. Cei mai dezvoltați mușchi sînt cei pectorali, care au rol în coborîrea și ridicarea aripilor. Marele pectoral este cel mai activ dintre toți mușchii, el se inseră cu un capăt pe stern, iar cu cel opus pe creasta humerală. La acțiunea marelui pectoral se adaugă cea a micului pectoral, care se inseră pe coracoid și humerus. Antagonist acestor doi mușchi care coboară aripile este mușchiul supracoracoid, mai puțin voluminos, care ridică aripile. Se secționează musculatura pectorală, paralel cu carena, pînă ce apare sternul. Cu o pensă se prinde sternul și se ridică ușor, iar cu un foarfece se taie coastele. Se desprind din articulație coracoidele și toracalele (claviculele) și se îndepărtează toate aceste părți scheletice. Se face apoi o incizie în musculatura abdomenului pînă la orificiul cloacal. Astfel se pune în evidență dispoziția „in situ" a tuturor organelor interne. Se spală bine de sînge cavitatea viscerală pînă ce apa rămîne clară iar organele se disting bine.

5.3.4.2. Dispozitia generală a organelor interne

La păsări o diafragmă asimetrică împarte cavitatea viscerală într-o cavitate toracică — superioară și o cavitate abdominală — inferioară. În regiunea cervicală se distinge, în prim plan traheea iar pe sub accasta esofagul care se dilată într-o gușă. La baza gîtului se observă tiroida, de culoare roșie și de formă ovoidă. În vecinătatea acesteia se găsesc două glande mici, sferice, de culoare gălbuie, paratiroidele. Deasupra tiroidei, se găsește timusul sub forma a două benzi cu conturul incizat, de culoare roz, foarte dezvoltat la păsările tinere.

În cavitatea toracică se află sirinxul, formațiune ce reprezintă o dilatare a părții inferioare a traheei (puțin dezvoltată la porumbel), inima voluminoasă învelită în pericard și plămînii simetrici cu poziție dorsală.

În cavitatea abdominală se găsește cea mai mare parte a sistemului digestiv (stomac, intestin, ficat, pancreas). Tot în această parte a cavității viscerale se găsesc și organele sistemului excretor și genital (fig. 173).

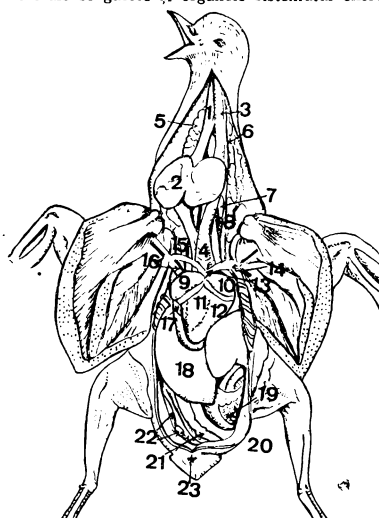


Fig. 173. Disecția la porumbel.
1. esofag; 2. gușă; 3. trahee; 4. sirinx; 5. timus; 6. vena jugulară; 7. tiroida; 8. paratiroide; 9. atriu drept; 10. atriu stîng; 11. ventricul drept; 12. ventricul stîng; 13. trunchi brahiocefalic; 14. arteră subclaviculară; 15. artera carotidă; 16. vena subclaviculară; 17. vena cavă inferioară; 18. ficat; 19. stomac triturator (pipotă); 20. ansă duodenală; 21. pancreas; 22. intestin; 23. deschiderea cloacală.

5.3.4.3. Sisteme de organe

Sistemul digestiv. Acesta începe cu cavitatea bucală lipsită de dinți. Pe planșeul cavității bucale se găsește limba musculoasă, lungă și mobilă, acoperită de o pătură cornoasă. Ea este prinsă la partea posteri-

oară) de osul hioid și are rol de organ gustativ. Cavitatea bucală se continâ cu esofagul lung, dilatabil, cu o guşă bilobată pe fața ventrală. Aceasta serveşte la acumularea hranei şi înmuierea ei. Urmează stomacul glandular (proventricul) care este mic, alungit, cu pereții subțiri şi bogați în glande. În acest segment al tubului digestiv, hrana înmuiată este supusă unui proces de digesie sub acțiunea sucurilor gastrice. Stomacul triturator (ventricul, pipotă), net delimitat de primul, are pereții musculoşi căptuşiți de o pătură keratinoasă. În acest stomac alimentele sînt sfărîmate şi supuse în continuare procesului de digestie. În apropierea regiunii dorsale a stomacului muscular se observă splina, care are o culoare roşie închisă. Urmează intestinul subțire a cărui primă parte, duodenul, formează o ansă îngustă care cuprinde pancreasul. Intestinul subțire, mult mai lung decît la reptile, descrie numeroase anse susținute de mezenter. Limita dintre intestinul subțire şi intestinul gros este marcată de o pereche de cecumi, care la porumbel sînt mici. Intestinul gros este scurt şi se deschide în cloacă. Aceasta este tricompartimentată ; în prima parte a sa, coprodeum, se deschide intestinul, în partea mijlocie, urodeum, se deschid conductele urinare şi genitale iar pe peretele dorsal al ultimei părți, proctodeum, se formează punga lui Fabricius, formațiune limfoidă, bine reprezentată la păsările tinere.

Ficatul este o glandă voluminoasă situată înapoia inimii. El este alcătuit din doi lobi, dintre care cel drept este mult mai mare. Vezica biliară lipseşte la porumbel. Din fiecare lob al ficatului porneşte un canal hepato-enteric. Cel ce pleacă din lobul stîng al ficatului este mai scurt şi se deschide în ramura descendentă a duodenului. Canalul ce pleacă din lobul drept este mai lung şi subțire şi se deschide în ramura ascendentă a duodenului. Ambele canale servesc la transportul bilei de la ficat la duoden.

Pancreasul este o glandă compactă, alungită, situată în ansa duodenală. Este alcătuit din lobi, dintre care doi ventrali şi unul dorsal. De la fiecare lob pleacă un canal care se deschide în ramura ascendentă a duodenului. Canalul lobului dorsal, mai lung şi mai subțire, se încrucişează cu canalul hepato-enteric drept.

Sistemul respirator. Este alcătuit din căile aeriene extrapulmonare (narine, fose nazale, coane, cavitatea bucală, laringe, trahee, bronhii primare), plămîni şi saci aerieni. Aerul ajuns în cavitatea bucală trece prin orificiul glotei într-un laringe rudimentar, susținut de aceleaşi cartilaje ca şi la reptile (cricoid şi aritenoide), situat la partea anterioară a traheei. Aceasta se întinde în lungul gîtului, paralel cu esofagul. Ea este susținută de inele cartilaginoase. În locul de bifurcare a traheii în cele două bronhii se găseşte organul fonator numit sirinx sau siringe, care prezintă la interior niște membrane ce vibrează la intrarea şi ieşirea aerului din trahee producînd sunete. Cele două bronhii, susținute şi ele de cartilagii inelare, pătrund în plămîni.

Plămînii sînt de dimensiuni mici, situați dorsal de o parte şi de alta a coloanei vertebrale, atașați strîns de coaste. Diafragma ornitică îi separă de celelalte organe ale cavității viscerale. Plămînii păsărilor apar compacți, spongioşi şi au o structură tubulară.

Sacii cu aer, în număr de 9 la porumbel, sînt prelungiri extrapulmonare ale bronhiilor intrapulmonare (mezobronhie și bronhii secundare). Dintre aceștia sacii abdominali sînt cei mai voluminoși.

Sacii cu aer au pereții subțiri, transparenți și nevascularizați. În timpul disecției se sparg ușor și nu mai pot fi puși în evidență intacți. Sacii cu aer au rol în ventilarea aerului pulmonar și în menținerea constantă a temperaturii corpului. La nivelul lor nu se realizează schimburi de gaze. Prezența sacilor cu aer este o caracteristică esențială a sistemului respirator la păsări.

Sistemul circulator. La păsări, inima învelită într-un pericard subțire este voluminoasă și tetracamerală. Prin îndepărtarea pericardului se disting cele două atrii cu pereții subțiri și de culoare mai închisă. Atriul drept este ceva mai mare decît cel stîng. Ventriculele au pereții groși, mai ales cel stîng, care prezintă și un volum mai mare. În atriul drept se deschid cele două vene cave anterioare și vena cavă posterioară, care colectează sîngele carbonatat din corp. În atriul stîng este adus sîngele oxigenat de la plămîni de vencle pulmonare. Din ventriculul drept pornește artera pulmonară, care se bifurcă în două ramuri ce duc sîngele carbonatat la cei doi plămîni. Din ventriculul stîng pleacă curbîndu-se spre dreapta cîrja aortică dreaptă care transportă sînge oxigenat. De pe acest arc aortic pornesc trunchiuri brahiocefalice simetrice care duc sîngele oxigenat la cap, gît, aripi și torace. Cîrja aortică se continuă pe sub coloana vertebrală cu aorta dorsală, ce distribuie sîngele oxigenat la toate organele cavității abdominale.

Sistemul excretor. Cei doi rinichi de tip metanefros, situați în fosele renale ale sinsacrumului sînt mari și alcătuiți din 3 lobi. La partea anterioară și internă a fiecărui rinichi, lîngă primul lob renal, se găsește glanda suprarenală, de culoare gălbuie. Pe marginea internă a rinichiului se distinge ureterul, care începe de la nivelul lobului median. Acesta se deschide în cloacă, în compartimentul mijlociu, urodeum. La păsări nu există vezică urinară.

Sistemul genital. La mascul există două testicule ovoide de culoare albicioasă, situate ventral față de lobul anterior al rinichiului. Pe fața internă a fiecărui testicul se găsește epididimul, puțin dezvoltat (rudiment al rinichiului embrionar mezonefrotic). El se continuă cu canalul deferent, subțire, sinuos și paralel cu ureterul. Înainte de a se deschide în cloacă canalul deferent poate forma o mică dilatare, vezicula seminală. Cele două canale deferente se deschid în urodeum, lateral și puțin înapoia deschiderilor urinare.

La femelă se dezvoltă o singură gonadă, ovarul stîng, care are o structură granulară, cu aspect de ciorchine. Ovarul se găsește situat la nivelul primului lob al rinichiului stîng. Se menține funcțional doar oviductul stîng (omolog al canalului Müller). Acesta este un tub lung care începe cu o pîlnie mare evazată, larg deschisă în cavitatea viscerală, în apropiere de vîrful rinichiului stîng. Oviductul prezintă mai multe segmente diferențiate structural și funcțional. Segmentul ce urmează pavilionului ciliat prezintă în pereții lui glande albuminoase care secretă albușul oului. În regiunea îngustă a oviductului, numită istm se găsesc glandele cochiliere, care secretă membranele ce acoperă albușul.

Partea terminală a oviductului, mai dilatată, reprezintă uterul, în pereții căruia există glande ce produc coaja oului, calcaroasă. Oviductul stîng se deschide lateral și puțin înapoia orificiului urinar stîng, pe peretele dorsal cloacal, în urodeum (fig. 174). Ovarul și oviductul drept rămîn

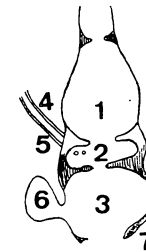


Fig. 174. Cloaca la păsări.
1. coprodeum ; 2. urodeum ; 3. proctodeum ; 4. canal deferent ; 5. ureter ; 6. punga lui Fabricius ; 7. sfincter.

într-un stadiu incipient de dezvoltare. Oul este mare, bogat în vitelus (telolecit). În cursul dezvoltării embrionare apar acelașiși anexe embrionare ca și la reptile (amnios și alantoidă).

5.3.5. DISECȚIA LA MAMIFERE (Clasa MAMMALIA — Ordinul LAGOMORPHA)

Mamiferele sînt vertebrate amniote, homeoterme, superior organizate. Ele constituie grupul cel mai evoluat de vertebrate datorită marii dezvoltări a sistemului nervos. Au o remarcabilă capacitate de adaptare la diferite moduri de viață, fapt ce a determinat o mare varietate de structuri.

Tegumentul se caracterizează prin prezența glandelor sebacee, sudoripare și mamare (ultimele glande, de origină mixtă) și a numeroase formațiuni cornoase, dintre care părul joacă un rol important în protejarea corpului. Membrele conformate primordial pentru mers pe sol pot suferi modificări profunde în legătură cu adaptarea lor la alt tip de locomoție.

Plămînii compacți, parenchimatoși, au o structură alveolară. Inima este tetracamerală și păstrează numai cîrja aortică stîngă.

Cu excepția monotremelor, mamiferele sînt vertebrate vivipare, nasc pui pe care îl hrănesc cu lapte, secreție a glandelor mamare. Oul este mic, microscopic, sărac în vitelus (oligolecit-alecit). În cursul dezvoltării apare, pe lîngă foițele embrionare anexe întîlnite și la reptile și păsări (amnios și alantoida), o formațiune specifică mamiferelor vivipare, placenta, cu rol în hrănirea și fixarea embrionului.

5.3.5.1. Tip reprezentativ Oryctolagus cuniculus (iepurele de casă)

Iepurele de casă prezintă capul mare în raport cu trunchiul, cu o regiune anterioară (facială) și o regiune posterioară (cranială) distincte. Orificiul bucal este mărginit de două buze. Cea superioară este despicată, fiecare jumătate avînd pe marginea inferioară cîte un lob acoperit

de peri. Buza inferioară prezintă şi ea lobi, dar de dimensiuni mai mici. La vîrful botului există o zonă lipsită de peri numită rhinarium, iar la partea superioară a acesteia se disting nările ca două fante. Pe bot poartă vibrise bine dezvoltate (mustăţi) (fig. 175). Ochii sînt mari, pro-

Fig. 175. Cap de iepure.

tejaţi de două pleoape mobile, care poartă pe margini peri lungi (gene). Membrana nictitantă este rudimentară, ea se menţine sub forma unei cute mici în colţul intern al ochiului. Lateral şi posterior se găsesc pavilioanele auditive bine dezvoltate, cu numeroase vase sanguine, care se observă prin transparenţa tegumentului. Gîtul, deşi nu este lung, prezintă o mare mobilitate. Trunchiul alungit se termină cu o coadă scurtă. Membrele sînt inegale, cele posterioare fiind mai lungi, în legătură cu deplasarea prin salturi. La membrele anterioare prezintă 5 degete, iar la cele posterioare 4 degete, degetul 1 fiind redus. Degetele sînt prevăzute cu gheare.

Tot corpul (excepţie rhinarium) este acoperit de blană formată din peri scurţi şi deşi şi puf moale la bază. Glandele sudoripare sînt puţin dezvoltate şi prezente numai în zona inghinală. Glandele mamare, 3—5 perechi, au poziţie abdominală.

Tehnica de lucru

Animalul sacrificat prin cloroformizare, într-un vas mai mare de sticlă închis etanş cu capacul, se aşează cu abdomenul în sus într-o tavă de disecţie sau pe o planşetă de lemn. Membrele se pot fixa de suport cu mici cuie. Se udă cu apă blana pe linia mediană a părţii ventrale dînd părul de-o parte şi de alta. Cu pensa se apucă pielea în partea posterioară a abdomenului şi cu o foarfecă se face o incizie pînă la unghiul mandibulei. La nivelul membrelor se fac secţiuni transversale pe prima (fig. 176). Se jupoaie pielea de pe faţa ventrală şi de pe laturile corpului şi se fixează de suport prin ace, scoţînd în evidenţă musculatura.

Pe linia mediană a părţii ventrale apare o linie albă, aponevroza fibroasă. Pe această linie se secţionează peretele muscular al cavităţii abdominale, de la orificiul urinar pînă la xifistern. De la acest punct se face secţiunea pe limita inferioară a toracelui. Se mai face o secţiune la nivelul membrelor posterioare. Lambourile musculare se întind lateral şi se fixează în ace. În acest fel se pune în evidenţă dispoziţia organelor cavităţii abdominale.

Pentru evidenţierea organelor cavităţii toracice se fac două secţiuni oblice prin coaste. Se taie şi claviculele. Se prinde sternul cu o pensă

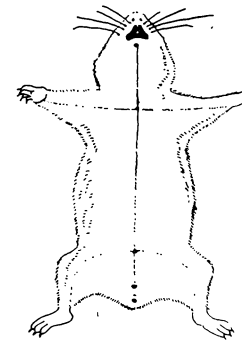


Fig. 176. Liniile de secționare a tegumentului pentru disecție la un mamifer.

și se ridică odată cu coastele secționate (la limita dintre partea cartilaginoasă și cea osoasă). Se înlătură aceste părți osoase lăsînd descoperită cavitatea toracică. Aceasta este separată de cea abdominală prin diafragmă, un mușchi circular și subțire, dar cu rol deosebit în respirație. Se secționează apoi musculatura gîtului.

5.3.5.2. Dispoziția generală a organelor

În partea superioară a regiunii cervicale se observă glandele salivare, iar la baza laringelui glanda tiroidă de culoare roșie, formată din doi lobi legați printr-un istm. În cavitatea toracică se află inima masivă. De o parte și de alta a ei se găsesc plămînii de culoare roz. La iepuri tineri baza inimii este acoperită de timus, o glandă bilobată, cu o structură spongioasă și de culoare deschisă.

În cavitatea abdominală se găsesc : ficatul masiv, brun-roșcat, format din cîțiva lobi, stomacul ca un sac cu o dispoziție transversală pe axa corpului și acoperit de lobii ficatului, splina alungită și plasată pe partea dreaptă și intestinul care descrie multe anse. Un cecum foarte mare acoperă în mare parte ansele intestinale. Dacă se trag pe partea stîngă ansele intestinale, apar în profunzimea cavității abdominale organele sistemului reproducător și excretor (gonade, gonoducte, rinichi, ureter, vezica urinară). Pe linia mediană, printre rinichi, trece vena cavă inferioară (de culoare închisă) și alături de ea aorta dorsală (ca un tub alb).

5.3.5.3. Sisteme de organe

Sistemul digestiv începe cu cavitatea bucală mărginită de două buze. Ea este împărțită într-un vestibul (delimitat de buze, dinți și obraji) și cavitatea bucală propriu zisă. Dinții înfipți în alveole sînt diferențiați morfologic și funcțional în incisivi, premolari și molari. Nu-

mărul lor reiese din următoarea formulă dentară : I 1/1 ; C 0/0 ; P 3/2 ; M 3/3. Incisivii superiori din prima pereche sînt mai mari decît cei din a doua pereche, dispuşi înapoia lor. Pe faţa lor mezială sînt acoperiţi de un strat mai gros de smalţ şi străbătuţi de un şanţ median încît par divizaţi. Incisivii sînt adînc înfipţi în maxilare şi au creştere continuă. Caninii lipsesc pe ambele maxilare. În spaţiul care apare între incisivi şi premolari, numit diastemă sau bară, pătrund lobii buzei superioare. Dinţii jugali (premolari şi molari) sînt prismatici şi au creştere prelungită. Ei aparţin tipului de dentiţie lofodont.

Pe planşeul bucal se găseşte limba, un organ musculos, a cărui mucoasă prezintă numeroase papile foliate şi circumvalate.

Următorul segment al tubului digestiv este faringele. El este împărţit de vălul palatin într-o zonă superioară (nazală) şi una inferioară (bucală). În zona nazală se deschid coanele, iar pe laturi orificiile trompelor lui Eustache. La nivelul faringelui se încrucişează calea respiratorie cu cea digestivă. Calea respiratorie merge prin laringe a cărui deschidere este acoperită reflex de epiglotă în timpul trecerii alimentelor prin esofag.

Tractusul digestiv se continuă cu esofagul care traversează cavitatea toracică, străpunge diafragma şi se continuă cu stomacul. Acesta este situat în cavitatea abdominală, imediat sub diafragmă. Are conturul unui sac piriform şi prezintă pe faţa anterioară mica curbură, iar pe cea posterioară marea curbură. Prima parte a stomacului este ceă cardiacă iar ultima pilorul, prevăzut cu sfincter.

Intestinul subţire este diferenţiat în duoden, jejun şi ileon. Duodenul descrie o ansă în formă de V. Intestinul subţire fiind lung descrie numeroase anse. La limita dintre intestinul subţire şi cel gros se găseşte un cecum intestinal foarte dezvoltat (el are aproximativ lungimea corpului) cu pereţii cutaţi. Capătul său liber este subţire şi neted şi poartă numele de apendice vermiform (fig. 177). El are rol în digerarea celulozei. De la baza cecumului porneşte intestinul gros care prezintă o ramură ascendentă (colonul ascendent), una transversală (colonul transvers) şi ultima descendentă (colonul descendent). Ultima parte a intestinului gros este rectumul, ce se deschide la exterior prin orificiul anal. Intestinul subţire şi gros se prinde prin mezenter de peretele corpului. Lungimea deosebită a intestinului la iepure este în corelaţie cu regimul de hrană vegetarian al acestui mamifer.

Glandele anexe tubului digestiv sînt glandele salivare, ficatul şi pancreasul. Glandele salivare dispuse perechi (glandele parotide, suborbitale, submaxilare şi sublinguale) îşi varsă produşii de secreţie prin conducte proprii în cavitatea bucală.

Ficatul este voluminos şi acoperă mica curbură a stomacului. El prezintă 6 lobi, dintre care 4 sînt mai mari. Suprafaţa anterioară a ficatului este convexă, urmînd conturul diafragmei. Dacă se ridică marginea ficatului se observă vezica biliară, de culoare verde, piriformă, situată în lobul drept medial. De la ea porneşte canalul cistic care împreună cu canalul hepatic formează coledocul ce se deschide în duoden, în apropierea pilorului.

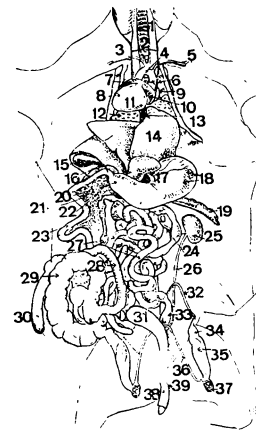


Fig. 177. Disecția la iepurele de casă *(Oryctolagus cuniculus)*:
1. arterele carotide comune; 2. anastomoza jugulară; 3. vena jugulară externă; 4. arc aortic; 5. artera și vena subclaviculară; 6. vena cavă anterioară; 7. atriul drept; 8. ventriculul drept; artera pulmonară; 10. atriul stîng; 11. ventriculul stîng; 12. plămîn; 13. vena cavă posterioară; 14. ficat; 15. vezica biliară; 16. ductul biliar; 17. esofag; 18. stomac; 19 splină; 20. pilor; 21. pancreas; 22. ductul pancreatic; 23. duoden; 24. artera și vena renală; 25. rinichi; 26. ureter; 27. ileum; 28. colon; 29. cecum; 30. apendice vermiform; 31. vezica urinară; 32. coarda spermatică (artera, vena și nervul); 33. rectum; 34. capul epididimului; 35. testicul; 36. canal deferent.

Pancreasul, de culoare deschisă, este situat în ansa intestinală duodenală. De la el pleacă un canal pancreatic, scurt și cu pereții subțiri. Acesta se deschide în curbura distală a duodenului.

Sistemul respirator începe cu narinele, prin care aerul trece în fosele nazale, în care există cornete nazale dezvoltate. Mucoasa ce acoperă aceste cornete reține particulele de praf și contribuie la încălzirea aerului inspirat. De aici aerul trece prin coane în faringe și apoi în laringe. În pereții laringelui se găsesc cartilajele tiroid și cricoid și 2 aritenoide mici. Între cartilajele aritenoide și tiroid se întind coardele vocale. În timpul deglutiției epiglota acoperă deschiderea laringelui.

Laringele se continuă cu traheea, un tub lung ce se întinde în lungul gîtului. Pereții săi sînt susținuți de inele cartilaginoase incomplete pe partea dorsală, care mențin lumenul continuu deschis. Capătul posterior al traheei se împarte în două bronhii care intră în plămîni. Aceștia sînt situați de-o parte și de alta a inimii, în cavitatea toracică. Au aspect spongios și o culoare roză. Ei sînt înveliți de două pleure subțiri, foițe viscerale ale peritoneului. Suprafața pleurelor este umedă și astfel ele alunecă ușor una peste alta, în timpul respirației. Plămînii sînt divizați în lobi: cel stîng este bilobat, iar cel drept are trei lobi dintre care cel inferior este subîmpărțit în lobi mai mici. În plămîni, bronhiile principale se divid în bronhii secundare, terțiare etc., formînd un arbore bronhic. La extremitatea acestora se găsesc sacii alveolari. La nivelul alveolelor pulmonare au loc schimburile de gaze.

Sistemul circulator prezintă inima situată în partea anterioară a cavității toracice, deasupra sternului, între cei doi plămîni. Ea este învelită într-un pericard subțire, prin transparența căruia se poate observa structura sa tetracamerală. Se îndepărtează cu grijă pericardul și se observă atriile rotunjite, care au o culoare roșie închisă și prezintă pe fața ventrală două urechiușe (auriculele). Ventriculele de culoare mai deschisă formează partea conică a inimii, cu peretele mai musculos (mai ales la nivelul ventriculului stîng). Limita dintre cele două ventricule este marcată de o dungă subțire adipoasă. Din ventriculul stîng pornește cîrja aortică stîngă (caracteristică mamiferelor) ce se curbează în formă de arc în lungul bronhiei stîngi. De pe cîrja aortică pornesc trunchiul brahiocefalic drept (care se subîmparte în arterele carotide și în artera subclaviculară dreaptă) și artera subclaviculară stîngă. Cîrja aortică se îndreaptă spre partea posterioară a corpului constituind înapoia inimii aorta dorsală. Trecînd prin diafragmă, ea dă ramificații în cavitatea abdominală, irigînd diferitele organe interne. Din ventriculul drept pornește artera pulmonară ce se ramifică în două artere ce merg la cei doi plămîni. În atriul drept se deschid venele cave anterioare și posterioare care colectează sîngele carbonatat din parteă anterioară și posterioară a corpului. În atriul stîng este adus sîngele oxigenat de cele 4 vene pulmonare.

Sistemul excretor este constituit din doi rinichi metanefrotici, situați de o parte și de alta a coloanei vertebrale, în cavitatea abdominală. Cei doi rinichi au o ușoară dispoziție asimetrică, cel stîng fiind situat puțin posterior celui drept. Pe partea superioară și oarecum internă a rinichilor se află glandele suprarenale, ce au aspectul unor corpusculi galbeni rotunjiți. Pe partea internă a fiecărui rinichi se găsește cîte un hil pe unde iese ureterul. Fiecare ureter, ce apare ca un tub alb cu pereții netezi, se deschide în vezica urinară unde se stochează urina. Vezica urinară are aspectul unui sac piriform, cu pereții subțiri. Ea se poate dilata mult. La partea posterioară se îngustează într-un gît care la femelă se continuă cu uretra scurtă, ce se deschide prin orificiul urinar. La mascul se continuă cu o uretră lungă, ce servește atît pentru evacuarea urinei cît și a lichidului spermatic.

Sistemul genital este alcătuit la femelă dintr-o pereche de ovare, mici și ovoide, susținute în cavitatea abdominală de ligamentul suspensor. Pe suprafața ovarelor mature proemineză foliculii ovarieni. Oviductele sînt tuburi subțiri și sinuoase. Ele se deschid în cavitatea peritoneală prin niște ostii. Fiecare pîlnie a oviductului este situată în apropierea ovarului. La extremitatea distală oviductul se lărgește constituind uterul. Uterele se unesc în partea lor posterioară formînd corpul uterin, dar lumenele lor rămîn separate (uter dublu). Capătul posterior al uterului, nefuzionat, formează corpul uterin. Corpul uterin se deschide în vagin. Acesta este căptușit de o mucoasă pliată ce formează cute longitudinale. Posterior, vaginul se deschide ca și uretra într-un sinus uro-genital (vestibulum). În partea terminală a vaginului se deschid glande ce corespund glandelor Cowper de la mascul. Vaginul și uretra se pot evidenția prin secționarea simfizei pubiene.

La mascul, testiculele sînt ovoide, învelite în albuginee. La iepurii tineri testiculele sînt intraabdominale, iar la cei maturi coboară în scrotum prin canalul inghinal. Pe fața dorsală a fiecărui testicul se găsește capul epididimului urmat apoi de corpul și coada acestuia. Epididimul se continuă cu canalul deferent care străbate canalul inghinal și pătrunde în cavitatea abdominală. După ce face o ansă, trece peste ureter și se deschide în uretră, pe partea dorsală, la baza vezicii urinare. Canalele deferente lărgite primesc și orificiile canalelor veziculelor seminale, care au dimensiuni mici la iepure.

Masculii au numeroase glande anexe (ampulare, coagulante, prostatice, Cowper etc.). Uretra străbate organul de copulație (penisul) fiind înconjurată de un corp spongios și de 2 corpi cavernoși (așezați dorsal față de primul). Se deschide la extremitatea penisului prin meatul urogenital.

5.4. PREPARAREA ȘI CONSERVAREA VERTEBRATELOR CA PIESE DE COLECȚIE

Vertebratele pot fi preparate și conservate ca piese de colecții în scop didactic sau științific sub formă de preparate biologice uscate (schelete), preparate în stare umedă (în lichide conservante), balguri și piese naturalizate.

5.4.1. PREPARAREA SCHELETELOR

Totalitatea pieselor dure care susțin și protejează corpul vertebratelor constituie scheletul. Există un exoschelet, la exteriorul corpului, cu rol de protecție la unele grupe de vertebrate (solzii peștilor, carapacea broaștelor țestoase, plăcile cornoase și dermice ale unor mamifere exotice) și un schelet intern sau endoschelet cartilaginos sau osos, cu rol în susținerea corpului, prezent la toate vertebratele.

În acest subcapitol ne vom referi la prepararea endoscheletului osos de la peștii ososi, amfibieni, reptile, păsări și mamifere.

Pentru prepararea acestor schelete sînt necesare următoarele ustensile și materiale :

ustensile : trusă de disecție ;

materiale : substanțe narcotice (cloroform, eter) pentru sacrificarea animalelor ;

neofalină pentru degresarea pieselor osoase ;

perhidrol, soluție 8—10%, pentru albirea pieselor osoase ;

suporturi de lemn, sîrme de diferite grosimi, ace cu gămălie, sfoară, carton ;

vase de sticlă pentru degresat și albit scheletul.

Prepararea pieselor scheletice implică obligatoriu următoarele operații : curățarea oaselor, degresarea, albirea și montarea.

Curățarea oaselor. Această operațiune constă în îndepărtarea părților moi (piele, mușchi, grăsime) de pe oase, păstrîndu-se doar ligamentele.

Curățarea se poate realiza în mai multe moduri : cu ajutorul insectelor carnivore, prin macerare, fierbere sau curățare în stare proaspătă cu instrumentele de disecție.

a) *Curățarea oaselor cu ajutorul insectelor* (furnici, viespi, carabide) este un procedeu vechi, folosit și astăzi la prepararea scheletelor mici și fragile (tritoni, șopîrle mici, lilieci). În acest scop animalul jupuit, eviscerat și curățat parțial se așează în apropierea sau pe mușuroiul de furnici sau în locuri frecventate de carabide sau viespi. Scheletul trebuie controlat din timp în timp pentru a nu fi atacate și ligamentele.

b) *Curățarea prin macerare.* Acest procedeu se bazează pe activitatea bacteriilor de putrefacție în condiții de anaerobioză. Scheletul curățat parțial se introduce într-un vas de sticlă (sau emailat) cu apă unde se ține pînă la putrezirea cărnii de pe oase. În cazul scheletelor mari se adaugă în apă var nestins. Laptele de var se schimbă la 3—4 zile. Scheletele mici nu se lasă prea mult timp la macerat pentru a nu se distruge ligamentele articulațiilor.

După macerare se scot din apă, se răzuie resturile de mușchi cu bisturiul. Piesele mari osoase se freacă cu peria. Se spală bine cu apă și se pun la uscat.

c) *Curățarea prin fierbere.* Este procedeul cel mai rapid dar nu se aplică decît în cazul scheletelor mari cu oase robuste. Nu se aplică în cazul peștilor, amfibienilor, șopîrlelor. În acest caz, după sacrificarea animalului, jupuirea și eviscerarea lui, se înlătură fasciculele groase de mușchi și se detașează capul de coloana vertebrală. Prin canalul neural al vertebrelor se trece o sfoară sau o sîrmă pentru ca în timpul fierberii acestea să nu se desprindă și să pierdem ordinea dispoziției lor. Oasele mari, cu măduvă, se perforează la cele două capete pentru ca în timpul fiertului să iasă conținutul din ele. Scheletul curățat parțial se pune la fiert într-un vas încăpător, la foc mic. Se controlează din cînd în cînd avînd grijă să nu se distrugă ligamentele. Cînd carnea se desprinde de pe oase se oprește fierberea. După răcire se freacă oasele cu o perie aspră sau se răzuie cu bisturiul pînă rămîn curate. Se spală și se pun la uscat.

d) *Curățarea scheletului în stare proaspătă.* Acest procedeu de curățare a scheletului imediat după sacrificarea animalului cu ajutorul trusei de disecție este mai migălos, dar păstrează ligamentele articulațiilor intacte. Se folosește în cazul scheletelor mici și mijlocii. Ca și în celelalte procedee se începe cu sacrificarea animalului prin narcotizare, jupuire și eviscerare. Cu o pensă se scot ochii din orbite și limba. La pești și amfibieni capul rămîne atașat de trunchi și se curăță în stare proaspătă. La reptile, păsări, mamifere, capul și gîtul se desprind de corp și se curăță cu bisturiul sau se fierb. Creierul se extrage din cutia craniană cu ajutorul unei sîrme cu buclă la capăt, și nu a unui ac spatulat.

Oasele trunchiului și membrelor se curăță bine de mușchi și grăsime folosind bisturiul și foarfeca, avînd grijă să nu se deterioreze ligamentele. Pentru înlăturarea completă a resturilor de mușchi scheletul se freacă cu o perie aspră. După curățare se spală cu multă apă și se pun la uscat toate piesele osoase.

Degresarea. Este operațiunea prin care se îndepărtează grăsimea de pe oase și din interiorul lor. Oasele lungi, cu măduvă, se perforează la extremități pentru ca prin orificiile făcute să pătrundă solventul. Se

introduce scheletul într-un vas cu neofalină (sau benzină) care apoi se acoperă bine. Această operație se execută într-o cameră cu ferestrele deschise, departe de orice sursă de foc. Degresarea durează de la cîteva zile pînă la 2 săptămîni, în funcție de mărimea scheletului și de conținutul în grăsime al oaselor. În acest timp neofalina se schimbă de 2—3 ori. După degresare oasele se pun la zvîntat.

Albirea. Este operația care se realizează după degresare. Ea este necesară deoarece oasele scoase din neofalină au o culoare gălbuie. Pentru albire se introduce scheletul într-un vas de sticlă cu soluție de perhidrol 8—12% sau chiar mai slabă, în funcție de fragilitatea oaselor. Timpul necesar pentru albire variază de la 20′ pînă la 10—12 ore în cazul scheletelor mari. După scoaterea pieselor osoase din soluția de perhidrol se spală cu multă apă și se pun la uscat. Scheletelor mici, nedesprinse în piese, li se dă o poziție cît mai aproape de cea reală.

Montarea. Este ultima operație prin care se reconstituie în întregime scheletul, dîndu-i poziția caracteristică animalului. Pentru a-i reda poziția corespunzătoare sînt necesare diferite suporturi, sîrme, bucăți de carton, ace cu gămălie, sfoară etc.

În cazul scheletelor mari, cu piesele componente desfăcute în timpul curățatului, acestea se reconstituie fie lipind oasele cu clei (obținut din celuloid dizolvat în acetonă) fie fixîndu-le cu bucăți de sîrmă. Vertebrele mari vor fi susținute de o sîrmă introdusă prin canalul neural al acestora. Capătul anterior al sîrmei, care depășește ca lungime coloana vertebrală, va susține craniul. În acest scop se înfășoară extremitatea anterioară a sîrmei, rămasă liberă, cu un strat subțire de vată, se îndoaie în formă de bucla și se acoperă cu vată pînă se formează un fel de dop. Apoi se introduce prin orificiul occipital în cutia craniană, unde se fixează cu clei de pereții acesteia. Se mai poate proceda și în felul următor: se introduce prin orificiul occipital un dop de plută, perforat în mijloc, care se fixează cu clei de pereții neurocraniului. Extremitatea anterioară a sîrmei se introduce în orificiul dopului de plută. Capătul posterior al sîrmei, mai ascuțit, împins prin răsucire pînă în regiunea codală a coloanei va susține vertebrele codale. Mandibula se va fixa la neurocraniu cu sîrmulițe. La speciile cu dinți bucali se verifică dacă aceștia sînt bine fixați pe maxilare, iar dacă se mișcă se lipesc cu clei.

Montarea scheletelor se face pe suporturi de lemn vopsite în negru. Pe aceste suporturi se fixează 1—3 tije metalice, bifurcate la capătul liber, de dimensiuni corespunzătoare înălțimii animalului, care vor susține coloana vertebrală în anumite puncte (fig. 178). Pentru susținerea scheletului de pasăre este suficientă o tijă, iar pentru cel de iepure sînt necesare 2 tije. În cazul scheletului de pește se folosesc 3 tije, două pentru susținera coloanei vertebrale și una pentru înotătoarele ventrale. Degetele membrelor se fixează de suport cu aracet, clei de lipit, sîrmulițe sau scoabe subțiri. Un schelet bine executat trebuie să redea corect curburile coloanei vertebrale, poziția corpului și modul de îndoire a picioarelor la nivelul articulațiilor.

Scheletele de broaște, șopîrle, șerpi se prind de postament direct, fără tije de susținere.

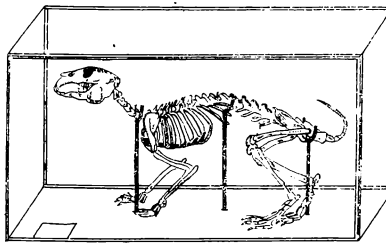


Fig. 178. Schelet de mamifer montat susținut de tije metalice bifurcate.

După montare piesa se etichetează. Eticheta trebuie să indice numele științific și popular al speciei căreia îi aparține scheletul, sexul, legenda cu denumirea oaselor (care se numerotează).

Pentru a feri de praf scheletele se introduc în cutii cu pereții de sticlă păstrînd ca bază suportul de lemn. Pereții de sticlă se fixează între ei și de suportul de lemn cu benzi de pînză sau hîrtie groasă, late de 2—3 cm, de culoare neagră. Acestea se întind simetric pe muchiile cutiei și se lipesc.

5.4.2. PREPARATE UMEDE (în lichid conservant)

Ciclostomii, peștii, amfibienii și reptilele se păstrează pe perioade mai lungi de timp în lichide conservante. În același mod se pot conserva fragmente de țesuturi și organe ca piese anatomice, ca și animale disecate pentru a pune în evidență organizația internă.

Pentru realizarea unui asemenea preparat sînt necesare următoarele materiale și ustensile : borcane anatomice, plăcuțe de sticlă, formol, alcool, glicerină, gelatină, acetonă, clorură de sodiu, glucoză, apă distilată, pastă de lipit din ceară de albine, trusă de disecție, seringă, tavă de disecție, plăcuțe de lemn, dopuri de sticlă de diferite mărimi, pensulă, ace, sfoară, ață de cusut.

Din materialul colectat pe teren se selecționează animalele intacte, fără leziuni și cu un colorit mai viu. După sacrificarea lor în acest scop se pregătesc pentru fixare în soluție de formol.

Ciclostomii, peștii și amfibienii al căror tegument secretă mult mucus se spală bine cu apă. Cu o seringă li se injectează în abdomen o soluție de formol de 4—6%, care se obține din 40 cm^3 apă și 4—6 cm^3 formol de 40%. Înainte de a fi introduse animalele în soluție de formol li se dă o poziție cît mai corectă. Peștilor li se întind cu grijă înotătoarele. În acest scop se întind pe plăcuțele de scîndură. Se va evita înțeparea directă a pieselor cu ace folosindu-se benzi de hîrtie, dopuri de plută, care se vor aplica peste partea piesei unde trebuie înfipt acul. Dacă vrem ca animalele să fie conservate cu gura deschisă, pentru a se observa anumite amănunte ale cavității bucale, se vor introduce între cele două maxilare bucăți de plută. Animalul fixat pe placa de lemn

se introduce în soluția de formol. Ca să nu plutească la suprafața lichidului se pun mici greutăți pe placă care să o mențină pe fundul vasului. Dacă vasul este prevăzut cu un strat de ceară, atunci fixarea se face direct pe acest substrat.

Fixarea preliminară durează cîteva zile în funcție de mărimea animalului sau a piesei anatomice, pînă ce preparatul devine rigid. Se scot acele, se înlătură benzile de carton, dopurile de plută.

Urmează fixarea definitivă. Ciclostomii și peștii se fixează pe plăci de sticlă dreptunghiulare pe măsura borcanelor anatomice pe care le vom folosi. Animalele se fixează cu ață subțire și rezistentă (sau fir de nylon) de culoare albă. În cazul peștilor ața va străbate corpul înapoia operculelor (printre înotătoarele pectorale) și la baza anală. Astfel fixați peștii se introduc în borcanele anatomice (fig. 179).

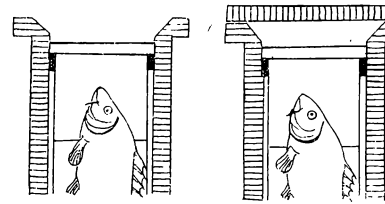


Fig. 179. Fixarea definitivă a peștilor: A. fixarea preparatului pe placa de sticlă și introducerea lui în borcanul de colecție; B. acoperirea borcanului de colecție cu placă de sticlă, care se lipește cu pastă caldă.

Pentru fixarea amfibienilor pe placa de sticlă se trece ața prin corpul lor în urma membrelor anterioare și înaintea celor posterioare. Ouăle embrionate, mormolocii în diferite stadii de dezvoltare se fixează direct pe placa de sticlă cu gelatină.

La șopîrle fixarea pe placa de sticlă se face trecînd ața prin corp înapoia capului și deasupra cozii. În cazul șerpilor, care au corpul mai lung fixarea se va face în 3—4 puncte. Ața care străbate corpul animalelor se înoadă pe una din marginile plăcuței de sticlă care trebuie să fie șlefuită. Astfel montată, piesa se introduce în borcanul de colecție. Placa de sticlă se imobilizează intercalînd de o parte și de alta, între ea și pereții borcanului, bucățele de plută. Urmează umplerea vasului cu lichidul conservant. Dacă după 8—10 zile soluția s-a tulburat, ea se înlocuiește cu alta proaspătă și clară, la care se adaugă 10—15% glicerină și cîteva cristale de timol pentru a împiedica formarea mucegaiului. Pentru păstrarea culorilor se poate adăuga o cantitate mică de sulfat de cupru.

În același mod se conservă și animalele disecate. Disecția se face pe animale proaspete. Organele interne se fixează în poziția dorită cu ajutorul acelor în tava de disecție. Se spală bine pînă nu se mai scurge nici o picătură de sînge. Preparatul se lasă 2—3 zile în soluție de formol de 4—5%. Apoi se scot acele și se fixează preparatul pe placa de sticlă. Pe organele puse în evidență se vor lipi cifre scrise cu tuș negru

sau la mașina de scris. Acestea se vor lipi cu gelatină concentrată încălzită cu puțină apă la flacără. Pentru ca ele să adere bine trebuie ca organele să fie bine zvîntate prin tamponare cu o pînză absorbantă.

După această operație, se introduce preparatul în borcanul de colecție și se procedează ca și în cazul conservării animalului întreg. Se toarnă soluția conservantă și se lasă 7—8 zile după care se schimbă cu alta clară, la care se adaugă și glicerină.

Borcanele cu dop rodat se închid bine, după care se unge locul de contact al dopului cu pastă de lipit caldă. În compoziția acestei paste intră următoarele : 150 g ceară de albine, 100 g colofoniu (sacîz) și 50 g seu de vacă topit. Aceste substanțe se topesc împreună și se amestecă omogen, după care se lasă la răcit. Pasta se aplică atît pe dop cît și pe marginile borcanului. Facultativ se poate acoperi dopul cu o băsică de bou, care se vopsește după uscare în negru.

Borcanul care se acoperă cu placă de sticlă se unge pe marginea superioară cu pastă. Apoi se încălzește capacul pe o sită deasupra unei flăcări. Capacul puțin răcit se montează începînd dintr-o margine a borcanului, în așa fel încît să adere bine de pastă. Se lasă să se răcească. Deasupra capacului se aplică învelitoarea din băsică de bou, care se întinde bine și se leagă cu o sfoară rezistentă imediat sub marginea superioară a borcanului. Se taie surplusul de învelitoare. După uscare aceasta se vopsește cu o pensulă cu vopsea duco sau lac negru. Borcanele se etichetează. Eticheta se lipește de regulă în partea superioară (de sub dop). Ea indică numele animalului, sexul, data colectării, locul și persoana care l-a colectat. La preparatele anatomice se adaugă o legendă cu explicația cifrelor atașate pe diferite organe.

Lichidul conservant se poate prepara după diferite rețete :

1) alcool 70—95% cu amestec de glicerină (10—15%) ; se recomandă pentru pești și amfibieni, dar nu și pentru ponta acestora, deoarece alcoolul distruge învelișul gelatinos al oului ;

2) soluție Bouin se folosește pentru conservarea pe timp îndelungat a pontelor și larvelor de amfibeni ; acestea se introduc mai întîi în soluție saturată (acid picric 75 părți, formaldehidă 25 părți, acid acetic 5 părți) timp de 5′ pontele și 1—2 ore larvele ; apoi se trec în soluție diluată Bouin (1 : 4 părți apă) ; se conservă culoarea și forma în timp ce formolul decolorează, iar alcoolul deformează prin deshidratare și decolorare ;

3) formol 3—5%, simplu sau în amestec cu glicerină (10—15%) sau cu clorură de sodiu ;

4) amestec de formol și alcool (500 cm^3 de apă distilată, la care se adaugă 5 cm^3 de formol de 40% în amestec cu 500 cm^3 alcool de 75%), pentru conservarea peștilor, șopîrlelor și șerpilor ;

5) amestec de formol 10%, acetonă și alcool 95% în părți egale, pentru conservarea diferitelor țesuturi și organe ;

6) amestec de alcool, glucoză, apă distilată și sare purificată (70 cm^3 alcool 95%, 25 cm^3 apă distilată, 5 g sare și 10 g glucoză pură).

5.4.3. CONSERVAREA SUB FORMA DE BALGURI

Confecționarea balgurilor se realizează mai ușor decît naturalizarea și constă în conservarea pielicelelor sub formă de burdufuri umplute cu talaș, vată sau mușchi.

5.4.3.1. Confecționarea balgurilor la păsări

Jupuirea unei păsări se face ca și în cazul naturalizării. Pielea se curăță și se tratează cu soluție saturată de acid boric, de acid salicilic sau de arsenic 25%. Capul se umple cu vată iar ciocul se închide și se leagă cu un fir de ață. Se confecționează un corp artifical din talaș sau mușchi care să respecte dimensiunile corpului natural. Se introduce în pielea făcută burduf, care se întinde cît mai bine în jurul lui. Aripile se strîng pe lîngă corp, iar picioarele se întind paralel pe sub coadă. Se aranjează penele pentru a reveni la poziția lor normală. Se întinde gîtul și se coase tăietura de pe partea ventrală a corpului. Pentru ca aripile să nu se îndepărteze de corp, se înfășoară de 2—3 ori cu o fîșie de hîrtie, care se va prinde cu un ac. Se întinde capul și ciocul în linie dreaptă cu corpul. Se lasă să se usuce 1—2 săptămîni după care se scoate bandajul și se pune eticheta definitivă.

5.4.3.2. Confecționarea balgurilor la mamifere

Mamiferele mici (insectivore, chiroptere, rozătare, etc.) se conservă tot sub formă de balguri. Ca și la păsări se face o tăietură în tegument pe linia mediană a abdomenului (fig. 180 a), pînă aproape de orificiul anal. Se desprinde pielea de pe corp, de-o parte și de alta a tăieturii, pînă se ajunge la membrele posterioare (fig. 180 b). Se taie piciorul deasupra articulației genunchiului (fig. 180 c). Se scoate coada din învelișul ei iar pielea se trage în sus spre cap prin întoarcere pe dos. Se continuă jupuirea pînă la membrele anterioare și se procedează la fel ca la cele posterioare. Pielea desprinsă de pe trunchi și membre se jupoaie în continuare și pe cap, cu grijă să nu se rupă la nivelul ochilor și urechilor. Dacă vrem ca balgul să păstreze craniul atunci lăsăm buzele

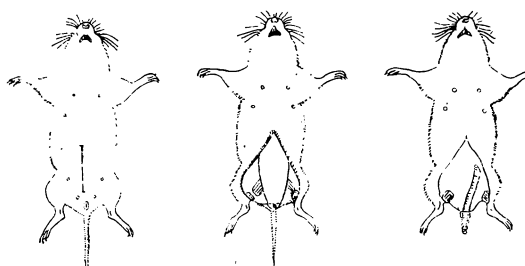


Fig. 180. Modul de secționare și de jupuire a tegumentului pentru confecționarea balgului unui mamifer mic: A. linia de disecție; B. modul de desprindere a tegumentului de corp; C. secționarea membrelor posterioare la nivelul genunchiului.

prinse de maxilare. Se îndepărtează corpul, se curăță bine pielea și oasele rămase atașate la ea. Se scoate creierul, care se înlocuiește cu un tampon de vată îmbibat în formol. Se recomandă să se lucreze foarte curat pentru a nu păta blana cu grăsime sau sînge. Ne putem folosi în acest scop de substanțe absorbante, ca : pudră de talc, amidon de cartof, rumeguș fin de lemn. Dacă pielea este grasă se introduce într-un vas cu benzină unde se lasă cel mult 12 ore. Apoi pielea curățată și uscată se tratează pe fața internă cu o soluție conservantă folosită și în cazul confecționării balgurilor de păsări. Se folosește cu rezultate bune o soluție apoasă de arseniat de sodiu (Na AsO_2-natrium arsenicosum), care se obține din 180 g arseniat de sodiu și 100 ml apă la 100°C. Lichidul conservant se mai poate prepara și după următoarea rețetă :

trioxid de arsenic (As_2O_3)	100 g
carbonat de sodiu (Na_2CO_3)	200 g
apă	1000 ml

Pensularea feței interne a pielii cu soluția conservantă se repetă de 2—3 ori pentru a nu rămîne suprafețe mici netratate. Pentru mamiferele mai mari (veverițe, hîrciogi, bizami, nutrii sau carnivore) se recomandă chiar argăsirea pielicelelor.

Pentru înlocuirea corpului natural îndepărtat se reconstituie mai întîi mușchii picioarelor, înfășurînd vată pe oasele rămase atașate la piele, apoi se confecționează un corp din vată, cîlți sau talaș fin, de lungimea și grosimea celui natural (fig. 181). Coada va fi susținută de

Fig. 181. Confecționarea corpului artificial.

un bețișor, o sîrmă sau o pană. Se întinde pielea pe corpul confecționat încît să nu se facă cute. Dacă mai rămîn spații goale se introduce vată. Se apropie marginile tegumentului secționat și se cos cu ață în culoarea blănii (fig. 182). Dacă s-a scos craniul se cos buzele pentru ca orificiul bucal să nu rămînă larg deschis. Balgul se fixează pentru uscare pe o plăcuță de lemn sau polistiren cu ajutorul acelor. Membrele anterioare se întind înainte iar cele posterioare înapoi, paralel cu corpul. Eticheta se prinde cu ață de membrul posterior drept (fig. 183). Balgurile se păstrează în cutii închise sau în sertare, unde se pulverizează la intervale de timp insecticid.

5.5. NATURALIZAREA

Constă în folosirea unui ansamblu de metode și tehnici în vederea conservării materialului biologic în stare naturală uscată. Naturalizarea se realizează prin : împăiere, mumificare și împrafinare.

Împăierea este o metodă clasică de naturalizare folosită la toate grupele de vertebrate, dar mai frecvent la păsări și mamifere. Conservarea pe această cale prezintă avantajul că piesele biologice păstrează

Fig. 182 Prinderea părților secționate ale tegumentului.

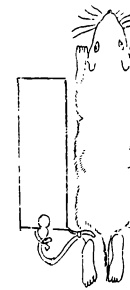


Fig. 183 Etichetarea balgului confecționat.

aspectul și caracterele lor naturale. Ele sînt un prețios material didactic, științific și muzeistic, constituinnd elementele esențiale în alcătuirea dioramelor și a biogrupelor.

Mumificarea este o metodă de naturalizare bazată pe principiul conservării cu ajutorul lichidelor conservante care se injectează în corpul animalelor, după care urmează uscarea.

Împarafinarea este o metodă mai modernă de naturalizare care constă în înlocuirea lichidelor din țesuturile corpului cu parafină. Se aplică în conservarea peștilor și reptilelor de dimensiuni mici.

5.5.1. TEHNICA ÎMPAIERII

Pentru realizarea împăierii la vertebrate sînt necesare următoarele materiale și ustensile :

Materiale

1) substanțe narcotice : eter, cloroform, pentru sacrificarea animalelor ;

2) materiale absorbante : praf de amidon, rumeguș fin de lemn ;

3) substanțe conservante : clorură de sodiu, alaun, soluție apoasă de arseniat de sodiu, soluție saturată de acid salicilic sau acid boric, soluție de formol (3—4%), alcool ;

4) materiale pentru confecționarea corpului : turbă, talaș, fîn, cîlți de cînepă sau in ;

5) materiale pentru modelare : caolină, plastilină, ipsos, pastă de hîrtie ;

6) materiale pentru montare : suporturi de lemn, sîrme de diferite grosimi, sfoară, carton, ochi artificiali ;

7) materiale diverse : ace de cusut, ață de diferite culori, vopsele, cleiuri de tîmplărie, aracet, dextrină, neofalină, perie, pieptene de metal.

Ustensile

1) instrumente de disecție : foarfecă, bisturiu, pensă ;
2) unelte de tîmplărie : cleşte de tăiat sîrmă, cleşte patent, pilă, ferăstrău, ciocan, şurubelniţe, burghiu, menghină.

Tehnica sacrificării include o serie de operaţiuni succesive :

1) sacrificarea animalului (unde este cazul) ;
2) curăţarea animalului la exterior ;
3) jupuirea ;
4) prepararea pielii (curăţare şi conservare) ;
5) confecţionarea scheletului de susţinere (din sîrme, carton) ;
6) confecţionarea corpului artificial şi fixarea lui cu sîrme ;
7) montare.

5.5.2. ÎMPAIEREA PEŞTILOR

Tehnica de împăiere a peştilor este puţin complicată şi accesibilă oricărui începător.

Se selectează în acest scop exemplarele cele mai frumoase de peşti (din materialul colectat), cu solzii bine înfipţi în tegument.

Fixarea. Se curăţă tegumentul prin spălare cu apă. Se întind înotătoarele. Pentru fixare se introduc peştii într-o soluţie de formol de 3—4% sau alcool de 75% şi se ţin aproximativ 12 ore. Cînd corpul s-a întărit puţin, se scot din baia de formol sau alcool, se spală cu apă şi se şterg cu o cîrpă moale din spre cap spre coadă, pentru a nu mişca solzii. Se iau principalele dimensiuni ale corpului : lungimea, grosimea şi înălţimea în cîteva puncte.

Jupuirea. Pentru realizarea acestei operaţii se face o incizie în tegument, pe partea ventrală a corpului, începînd din dreptul istmului, branhial pînă în regiunea cozii. Incizia va ocoli orificiul anal. Desprinderea pielii de pe corp se face cu ajutorul unei lame de bisturiu începînd dinspre partea centrală a corpului către coloana vertebrală, pe ambele laturi. Operaţia se realizează cu atenţie pentru a nu tăia tegumentul. Se are grijă ca pielea să nu se cuteze şi să se desprindă solzii de pe ea. Cînd se ajunge cu jupuirea în dreptul înotătoarei dorsale aceasta se secţionează de la bază. La fel se va proceda şi cu celelalte înotătoare. După ce operaţia de jupuire s-a terminat se taie coloana vertebrală, anterior în apropierea orificiului occipital şi posterior la baza înotătoarei codale. Se înlătură corpul. Cu ajutorul unei sîrme cu buclă se scoate creierul prin orificiul occipital. Se introduce în locul acestuia un tampon de vată îmbibat în formol. Se scot ochii din orbite cu vîrful bisturiului, introducîndu-se în locul lor tot un tampon de vată. Prin gură se îndepărtează muşchii capului şi limba, iar prin deschiderile operculare se scot branhiile.

Prepararea pielii. Se curăţă pielea la interior de resturile de muşchi şi grăsime. Astfel pregătită se introduce într-o soluţie de formol 2%, iar apoi se pensulează cu soluţie de arseniat de sodiu.

Confecţionarea corpului artificial. Corpul artificial se confecţionează în mai multe feluri. Prin cel mai simplu procedeu acesta se realizează din două cartoane flexibile care vor reproduce identic forma şi mărimea corpului natural. La partea anterioară a cartonului se decu-

pează o limbă. Cele două cartoane se suprapun şi se cos pe margini. Se confecţionează un schelet din sîrmă care va înlocui coloana vertebrală. Acesta se introduce în spaţiul delimitat de cele două cartoane prin deschiderea anterioară. El va fi susţinut de 1—2 tije de sîrmă fixate pe un suport de lemn. Sîrmele vor străbate corpul de carton pe muchea inferioară. După fixarea scheletului se umple corpul de carton cu talaş mărunt sau cîlţi. Apoi se introduce în pielea curăţată şi tratată cu soluţia conservantă. Se întinde bine să nu formeze cute. Limba cartonului se introduce în orificiul occipital, iar capătul îngust al corpului de carton se va sprijini pe baza înotătoarei codale. În spaţiile de sub pielea capului, rezultate prin îndepărtarea muşchilor şi branhiilor, se introduce plastilină şi pastă de hîrtie. Pentru a fi siguri că pielea nu se va încreţi se recomandă ungerea ei, pe faţa internă, cu clei pentru a adera în întregime la corpul de carton. Cele două margini ale tegumentului incizat se apropie şi se ung cu clei pentru a se lipi de corpul de carton. Este bine să se aplice pe tăietură un strat de pastă de hîrtie.

Uscarea piesei se face la o temperatură de 18°C.

Montarea. După uscarea completă a piesei se montează ochii de sticlă în orbite. Fixarea se face cu clei sau plastilină. Se scot cartoanele cu care am fixat înotătoarele şi se aduc piesei ultimele retuşuri. Părţile care şi-au pierdut culorile naturale se retuşează cu un strat subţire de vopsea, de o culoare cît mai apropiată de cea naturală. Pe tot corpul se aplică un strat subţire de lac incolor. Postamentul din lemn, ca şi sîrmele care susţin corpul se vor vopsi în negru. Pe postament se lipeşte eticheta, care va indica specia, locul şi data colectării.

Piesa astfel montată poate fi păstrată într-o cutie cu pereţii de sticlă pentru a o feri de praf. Nu va fi expusă razelor de soare care cu timpul ar scoroji pielea. La anumite intervale de timp se pulverizează soluţie insecticidă pentru ca piesa să nu fie atacată de insecte.

5.5.3. ÎMPĂIEREA AMFIBIENILOR

La amfibieni împăierea se realizează mai uşor decît la peşti, deoarece jupuirea pielii se face fără dificultate.

Jupuirea. După sacrificare cu eter sau cloroform se aşează animalul cu abdomenul în sus pe planşetă sau în tava de disecţie. Se secţionează tegumentul pe linia mediană, din dreptul membrelor anterioare pînă aproape de orificiul cloacal. Pielea se desprinde uşor de pe tot corpul, cu excepţia capului unde aderă strîns la craniu. Se desprinde tegumentul de pe picioare fără ca acestea să se înlăture. Se curăţă însă bine oasele de muşchi şi tendoane. Se înlătură corpul, păstrîndu-se doar scheletul membrelor.

Prepararea pielii. Pielea curăţată se spală cu alcool şi se pensulează pe faţa internă cu o soluţie conservantă, acid salicilic sau arseniat de sodiu.

Confecţionarea corpului artificial. Se pregătesc 4 sîrme (galvanizate) de 1 mm diametru, care se introduc prin laba piciorului în interiorul pielii. Capătul care se introduce se înfăşoară în jurul oaselor picioarelor. Capătul opus al sîrmei, ce iese în afara labei cu 4—5 cm, se fixează la un suport de lemn. Prin incizia făcută pe faţa ventrală se

introduce pastă de hîrtie sau chit. Pe măsură ce introducem pasta se modelează continuu corpul animalului, folosind un mic cuțit de lemn.

Printr-un alt procedeu se detașează pielea de pe corp și odată cu aceasta se îndepărtează toate piesele scheletice, cu excepția craniului, și falangelor degetelor. Se extrage creierul din neurocraniu și se tamponează în interior cu vată îmbibată în formol.

După curățarea pielii și tratarea ei cu o soluție conservantă se coase tăietura ventrală. Pasta de umplut se introduce prin cavitatea bucală. Se împinge în tot burduful. Prin modelare se dă forma corpului.

Montare. Se întind labele pe postamentul de lemn și se lipesc. Se lasă să se usuce. Se curăță la suprafață de urmele lăsate de pastă cu un tampon de vată. Se vopsește pielea respectînd culorile reale. Se dă apoi un strat de lac incolor pe toată suprafața corpului pentru a proteja pielea. Se fixează ochii ca și la pești. Se etichetează și se introduce piesa obținută într-o cutie cu pereții de sticlă pentru a o feri de praf.

5.5.4. IMPĂIEREA BROAȘTELOR ȚESTOASE

Tehnica de lucru este simplă și în cazul broaștelor țestoase. Sacrificarea animalului se face prin narcotizare cu cloroform sau eter. Înainte de jupuirea pielii este necesară îndepărtarea țestului. În acest scop se taie țesutul cu un ferăstrău sau cu bisturiu (la broasca țestoasă de apă) pe linia de sutură a carapacei cu plastronul (fig. 184). Se decupează pielea de pe carapace, lăsînd-o atașată la plastron.

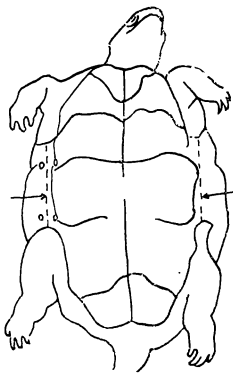
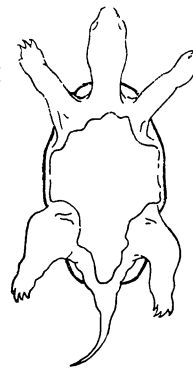


Fig. 184. Liniile de secționare a țestului de broască țestoasă *(Emys orbicularis)* pentru îndepărtarea carapacei.

Jupuirea. Se decupează pielea de pe carapace lăsînd-o atașată doar la plastron. Această operație se realizează cu bisturiul. Se taie coloana vertebrală la nivelul gîtului (cît mai aproape de cap) și la baza cozii, apoi membrele (la nivelul centurilor). Se îndepărtează carapacea, care



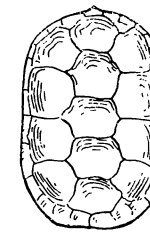


Fig. 185. Broasca testoasă de apă *(Emys orbicularis)* cu carapacea și viscerele îndepărtate.

se curăță de resturile de mușchi, grăsime și sînge. Se eviscerează corpul rămas atașat la plastron (fig. 185). Se jupoaie cu atenție pielea de pe craniu, atît cît este posibil deoarece este foarte aderentă. Se curăță oasele craniului, se scot ochii, limba și creierul. În continuare se jupoaie pielea de pe membre. Se curăță bine oasele acestora de mușchi, grăsime și sînge, apoi se trage pielea pe ele. Coada se scoate complet din învelișul tegumentar și se înlocuiește cu una artificială, din sîrmă.

Prepararea pielii. Se curăță bine pielea de resturile de mușchi, grăsime și sînge. Cu o pensulă se unge pe fața internă cu o soluție pe bază de arsenic.

Cu aceeași soluție se tratează și oasele capului, membrelor, plastronul și carapacea. Această operație are o deosebită importanță pentru conservarea piesei împăiate, de aceea trebuie executată cu multă atenție.

Confecționarea corpului artificial. Se taie 6 bucăți de sîrmă de aceeași grosime pentru susținerea capului, cozii și membrelor. Se ascut cu o pilă la ambele capete. Corpul artificial se confecționează din talaș sau cilți, pe care îi legăm cît mai strîns cu o sfoară sau ață groasă. Se modelează pînă ce ia forma carapacei. Se păstrează dimensiunile corpului natural, încît carapacea și plastronul să se îmbine ușor pe linia de sutură. Se introduc sîrmele membrelor pe lîngă oasele rămase sub piele. Una din extremitățile sîrmei va străpunge talpa piciorului, cealaltă se leagă de axa osoasă a piciorului, fie cu sîrmuliță, fie cu ață rezistentă, avînd grijă ca articulațiile să rămînă libere.

Mușchii picioarelor sînt înlocuiți cu vată sau cilți care se înfășoară în jurul oaselor, întărindu-se cu sîrme.

Pielea gîtului se întoarce pe dos iar sîrma de susținere a capului se introduce prin orificiul occipital. Aceasta va străpunge oasele cra-

niului în regiunea parietală. Cu un cleşte se trage capătul sîrmei în afara craniului şi se îndoaie în formă de scoabă. Muşchii gîtului vor fi înlocuiţi cu vată sau cîlţi, care se vor înfăşura în jurul părţii libere a sîrmei care susţine capul. Tot din vată şi cîlţi înfăşuraţi în jurul sîrmei se va confecţiona coada, care se introduce în învelişul ei tegumentar.

Urmează operaţia de asamblare a pieselor. În acest scop se aşează corpul artificial pe plastron. Se introduc în el sîrmele ce susţin capul, membrele şi coada. Capetele sîrmelor ce străpung corpul artificial se trag cu cleştele afară şi se îndoaie în formă de scoabă, fixîndu-le cît mai bine la trunchi.

Pielea rămasă ataşată la plastron se coase în jurul corpului în aşa fel încît cusătura să nu se observe de sub carapace (fig. 186).

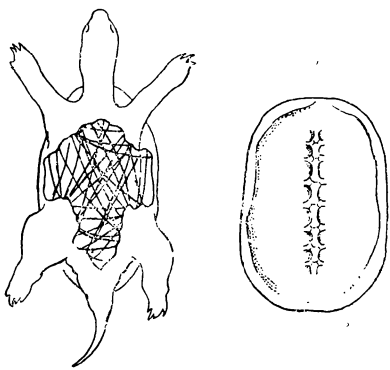


Fig. 186. Broasca testoasă împăiată înainte de ataşarea carapacei.

Montarea. Se fixează ochii în orbite cu caolină sau plastilină. Se curăţă carapacea cu o perie avînd grijă ca apa să nu pătrundă sub ea. Apoi carapacea se lipeşte de plastron cu clei.

Se aşează animalul într-o poziţie cît mai naturală şi se lasă la uscat 3—4 zile la temperatura camerei, ferit de lumina solară. După uscare se aplică un strat de lac incolor pe suprafaţa piesei. Se fixează pe un suport de lemn vopsit, prevăzut cu 4 găuri. Prin aceste găuri se introduc sîrmele picioarelor, iar capetele lor se vor îndoi sub postament. Pe postament se lipeşte eticheta care indică numele speciei, locul şi data colectării ca şi numele colectorului.

5.5.5. ÎMPAIEREA PĂSĂRILOR

La păsări naturalizarea prin împăiere constituie o operație mai complexă, care necesită pe lîngă cunoștințe de anatomie, de însușirea tehnicii de lucru și multă îndemînare.

Păsările care nu au fost vînate dar fac obiectul împăierii se sacrifică prin narcotizare cu cloroform sau eter. O pasăre pentru a fi bună de împăiat trebuie să îndeplinească anumite condiții :

— să fie proaspăt vînată sau sacrificată (de 3—4 ore), pentru ca fulgii de pe abdomen să nu se desprindă ușor ;

— să fie intactă, iar pielea să nu fie prea ruptă de alice ;

— să aibă penajul frumos.

Dacă pasărea îndeplinește aceste condiții atunci se trece la curățatul ei. Cu o cîrpă umedă se șterg picioarele și ciocul. Petele de sînge, ca și alte urme lăsate pe penaj, se scot prin spălare cu apă. Se curăță pata prin frecarea penajului cu un tampon de vată îmbibat în apă. Apoi se șterge locul cu vată uscată. Dacă este necesar se spală cu neofalină (dacă petele sînt de grăsime). Se usucă cu praf de amidon sau rumeguș, după care se scutură penajul. Uscarea penelor se mai poate face și cu ajutorul unui phön.

Înainte de a trece la jupuirea păsării se stabilesc următoarele date :

— culoarea ochilor, a părților glabre (fără pene), a ceromei și a picioarelor ;

— lungimea totală a corpului (de la vîrful ciocului pînă la extremitatea distală a cozii) (fig. 187 A) ;

— anvergura aripilor (distanța între vîrful aripilor întinse) (fig. 187 C) ;

— lungimea aripii (de la articulația carp-metacarp pînă la vîrful celei mai lungi remige) (fig. 187 B) ;

— lungimea ciocului (de la bază pînă la vîrf) (fig. 187 D) ;

— lungimea tarso-metatars (de la articulația tibio-tarsală pînă la articulația tarso-metatarsului cu degetele (fig. 187 E) ;

— lungimea degetelor : a degetului III (median) și a degetului I (hallux) (de la baza tarso-metatarsului pînă la vîrf, fără gheară) (fig. 187 F) ;

— lungimea cozii (de la baza ei pînă la extremitatea celei mai lungi rectrice) (fig. 187 G).

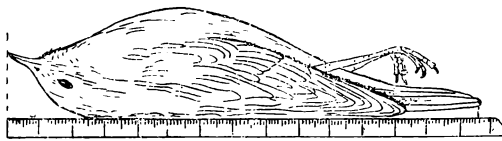
Toate datele se trec pe o etichetă pe care se mai înscriu : denumirea științifică a păsării, locul și data colectării, numele colectorului.

Jupuirea. Înainte de a începe această operațiune se previne scurgerea conținutului tubului digestiv, ce ar putea murdări penele, introducînd un tampon de vată prin orificiul bucal în esofag și un alt tampon în orificiul cloacal.

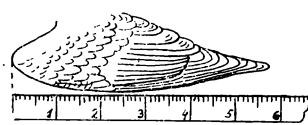
Se așează pasărea pe planșeta de lucru cu abdomenul în sus și capul înainte. Se face o cărare în penaj pe linia medio-ventrală a abdomenului,

dînd penele într-o parte și în alta, apoi se taie tegumentul cu lama unui bisturiu sau cu o lamă de ras. Tăietura începe în dreptul sternului pînă la orificiul cloacal (fig. 188 A). Ea trebuie să fie superficială, să nu străpungă mușchiul abdominal.

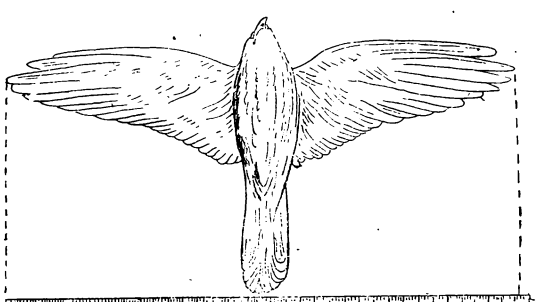
La păsările acvatice (gîște, rațe, corcodei, etc.) cu mult puf și grăsime pe partea ventrală se recomandă să se facă tăietura pe fața dorsală,



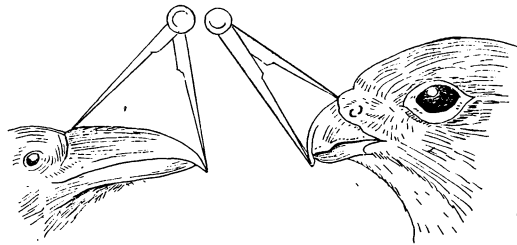
A

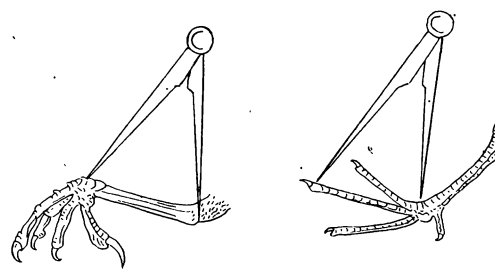


B



C





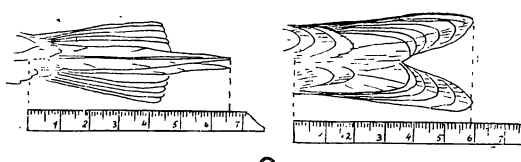


Fig. 187. Dimensiunile corpului la păsări: A. lungimea totală a corpului; B. lungimea aripii; C. anvergura aripilor; D. lungimea cioculuí; E. lungimea tarso-metatarsului; F. lungimea degetului III (fără gheară); G. lungimea cozii.

cît mai aproape de una din aripi. După secționarea pielii se desprind marginile cu degetele și se începe jupuirea (fig. 188 B). Pe măsură ce se desprinde pielea se întind peste musculatura dezvelită straturi de vată sau se presară rumeguș fin și uscat (sau amidon), pentru a evita murdărirea penelor de sînge. Se jupoaie pielea și pe o latură și pe alta a corpului. Cînd piciorul a fost degajat se împinge mult înainte și se taie cu o foarfecă (sau un clește dacă pasărea este mare) la nivelul articulației tibio-femurale (fig. 188 C), după care se trage înapoi sub piele. Se continuă jupuirea pe spate, pe crupion pînă la coadă. Vertebrele codale se taie cu foarfeca puțin mai sus de pigostil. Se continuă

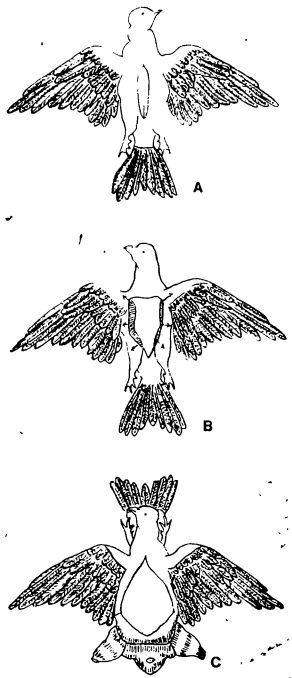


Fig. 188. Fazele de jupuire a tegumentului la pasăre: A. linia de secționare; B. modul de desprindere a tegumentului; C. secționarea membrelor posterioare la nivelul articulațiilor tibio-femurale.

desprinderea pielii înaintînd către partea anterioară a corpului pînă se ajunge la nivelul aripilor. Acestea se desprind de trunchi printr-o secțiune la nivelul articulației humero-scapulare, rămînînd atașate la piele. Se jupoaie pielea de pe gît trăgînd-o ca o cămașă peste cap. Apoi se desprinde pielea de pe cap pînă în dreptul urechilor. Cu vîrful bisturiului se desface membrana timpanică cît mai aproape de os.. La păsările mici aceasta se desprinde ușor. Este necesară multă atenție cînd se ajunge la nivelul ochilor pentru a nu tăia pleoapele (fig. 189). În acest scop

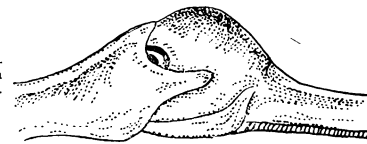


Fig. 189. Desprinderea tegumentului de pe cap la nivelul urechii și ochiului.

se face cu bisturiul o secțiune transversală în membrana nictitantă, care acoperă globul ocular, apoi se degajează pleoapele în jurul orbitei. Tot cu bisturiul se scoate globul ocular secționînd mușchii orbiculari și nervul optic. Se face cu grijă operația pentru a nu sparge globul ocular, iar lichidul din el să păteze penele. Se desprinde pielea de pe cap pînă la baza ciocului.

La păsările cu gîtul subțire și capul voluminos este necesară o incizie în tegument în lungul gîtului fie pe linia medio-dorsală fie pe cea medio-ventrală.

După desprinderea pielii de pe cap, acesta se detașează de corp secționînd coloana vertebrală la nivelul primei vertebre cervicale. Se curăță oasele craniului de mușchi și se extrage creierul, cu o sîrmă cu buclă, prin orificiul occipital, pe care îl lărgim cu bisturiul.

La nivelul aripilor pielea se desprinde de pe brat și antebrat și se curăță oasele de mușchi și tendoane. Dacă aripile sînt mari se recomandă o secțiune, pe fața ventrală, în lungul lor (humerus, radius, metacarpianul III) pe unde se vor curăța oasele de mușchi și tendoane.

Pe picioare pielea se jupoaie pînă la articulația genunchiului (tibiofemurală) sau pînă la degete, dacă tarso-metatarsul este acoperit de pene. Se curăță bine oasele de mușchi și tendoane. Dacă pasărea are picioarele înalte și groase se mai face o tăietură între degete, iar cu un cîrlig se scot tendoanele și puținele fibre musculare care mai există (fig. 190). Tot prin această tăietură se inoculează cu o seringă o soluție conservantă.

La urmă se curăță și vertebrele cozii rămase atașate la coadă și se înlătură glanda uropigiană. Se freacă locul cu rumeguș uscat. Operația se execută cu atenție ca să nu se taie ligamentele rectricelor și acestea să se desprindă.

Prepararea pielii. Se întoarce pielea pe dos, scoțînd în afară craniul, oasele membrelor și ale cozii. Se curăță de pe fața internă a pielii

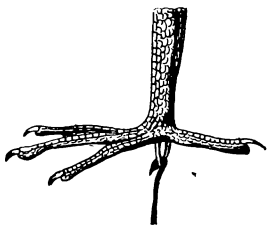


Fig. 190. Scoaterea tendoanelor de la membrele posterioare cu ajutorul unui cîrlig.

toate resturile de mușchi, grăsime, cheaguri de sînge. Se cos găurile existente făcute de alice sau rupturile produse în timpul lucrului. Apoi se tratează cu o soluție conservantă fie pe bază de arsenic fie de acid salicilic. Se pensulează bine întreaga suprafață, inclusiv la nivelul aripilor, gîtului și capului. Se va insista asupra suprafeței de la baza ciocului, a cozii și a locului de inserție a penelor. Se ung cu soluție și părțile osoase care rămîn atașate la piele.

După terminarea acestei operații pielea se întoarce iarăși pe față (cu penele la exterior) și se lasă să pătrundă în ea lichidul conservant. Uscarea și curățarea definitivă a penajului se face prin frecare cu rumeguș sau amidon care apoi se scutură bine. Penele se aranjează cu o pensă.

Confecționarea corpului artificial. Acesta se realizează din talaș, cîlți sau mușchi, care se strîng și se înfășoară cu ață rezistentă sau sfoară pînă ce iau forma și dimensiunile corpului natural. Ața sau sfoara se trece de mai multe ori în jurul corpului artificial în diferite direcții, încît în final să dea aspectul unei împletituri cu ochiuri mari, neregulate.

Se taie apoi 6 bucăți de sîrmă : 2 mai groase, vor susține picioarele, 2 mai subțiri vor sprijini aripile, una va înlocui gîtul iar ultima va susține coada. Sîrmele care se taie mai lungi decît piesele care le vor susține (cam de două ori lungimea acestora) se ascut la ambele capete.

Se introduce sîrma ce va susține gîtul și capul cu un capăt în partea anterioară a corpului confecționat. În jurul ei se înfășoară vată sau alt material moale de umplutură. Se modelează gîtul artificial respectînd grosimea și lungimea celui natural.

În fiecare picior se introduce prin talpă cîte o sîrmă mai groasă, care se împinge în lungul oaselor în așa fel încît capătul anterior să depășească cu cîțiva centimetri lungimea acestora. Sîrma se leagă de tibie cu ață sau sfoară subțire. Se înlocuiesc mușchii picioarelor cu vată sau cîlți care se înfășoară în jurul sîrmei și axei osoase (fig. 191). Se întinde apoi tegumentul pe picioare.

Sîrmele aripilor se introduc pe lîngă humerus și se împing pe sub piele, printre radius și ulna, pînă ce capătul lor se fixează în vîrful aripii. Sîrma se leagă de humerus cu ață.

Se introduce corpul artificial în burduful de piele. Prima operație care urmează constă în atașarea capului la trunchi. Se introduce sîrma

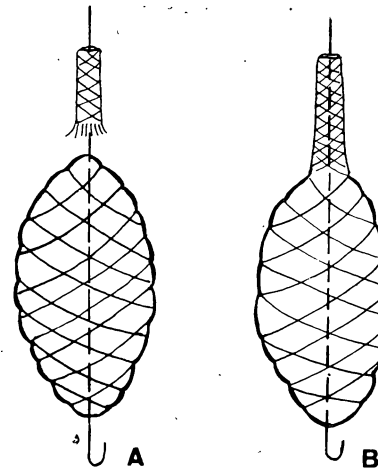


Fig. 191. Confecționarea corpului artificial: A. introducerea sîrmei de susținere a gîtului și corpului artificial; B. modelarea gîtului artificial.

care modelează gîtul cu capătul liber prin orificiul occipital. Cu vîrful ascuțit se străpung oasele craniului și pielea de la baza cioculuí. Capătul sîrmei ce iese afară se lasă așa pînă la uscarea piesei, după care se taie cu un clește de la bază. Se umplu orbitele cu caolină sau plastilină și se întinde pielea pe cap.

Sîrmele aripilor vor străpunge corpul artificial prin partea dorsolaterală a lui. Se împing aceste sîrme pînă ce humerusul se apropie de corp. Capetele sîrmelor care ies pe partea ventrală a jumătății anterioare a corpului se îndoaie și se înfig în ghemul de talaș.

Sîrmele picioarelor vor străpunge corpul prin partea posterioară pînă la jumătatea lui. Capetele se împing afară și se trag cu un clește pînă ce axul piciorului aderă la corp, apoi se îndoaie în formă de scoabă și se bat în ghemul de talaș.

Urmează fixarea sîrmei care trebuie să susțină coada și care în prealabil s-a trecut prin vertebrele codale. Aceasta se înfige în partea posterioară a corpului confecționat, procedîndu-se ca și în cazul celorlalte sîrme.

Se întind picioarele în prelungirea corpului, paralel cu coada și se verifică dacă toate sîrmele au fost fixate bine, dacă nu rămîn goluri între corp și piele, care ar deforma conturul corpului. Dacă există asemenea deficiențe se remediază prin adăugare de vată sau cîlți. Dacă totul a decurs bine se apropie marginile tegumentului secționat și se cos

începînd din partea anterioară a tăieturii, cu ață la culoare. Se face o cusătură încrucișată trecînd acul într-o parte și în alta a tăieturii, pe sub piele, fără a prinde penele.

Montarea. Pasărea astfel pregătită se montează pe un postament de lemn vopsit sau lăcuit, fie direct, fie pe o ramură de arbore sau arbust pe care putem lipi licheni și mușchi. Sîrmele ce susțin picioarele și care ies prin labă se introduc prin găurile făcute în postament sau în fragmentul de cracă. Capetele lor se îndoaie în formă de scoabă și se fixează pe dedesubtul suportului.

Se așează pasărea în poziție caracteristică. De fapt, modelarea constituie ultima operație și cea mai dificilă prin care se redă păsării montate expresivitate, mișcare, etc. În acest scop este necesară deprinderea, fantezia, talentul și o bună cunoaștere a biologiei speciei.

Prin îndoirea picioarelor de la articulații se va încerca să se redea o poziție cît mai normală de mers sau staționare. Se vor modela aripile, care pot fi fixate strîns pe lîngă corp sau întinse în poziție de zbor. Poziția gîtului și a cozii are importanță în redarea unei expresii comportamentale.

Pentru a menține poziția aripilor și a cozii acestea se susțin cu cartoane prinse cu ace cu gămălie, ață sau sîrmă (fig. 192). La păsările cu

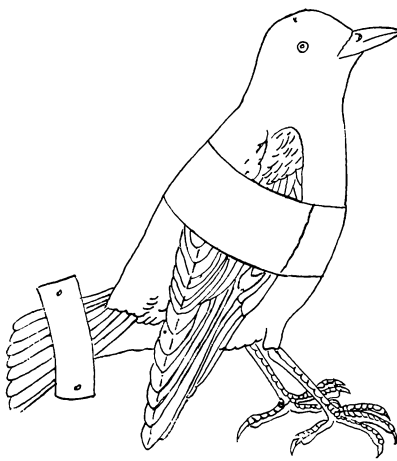


Fig. 192. Montarea păsării și susținerea corpului și cozii cu bandaje de carton.

creastă și bărbie acestea se presează între bucăți de carton prinse tot în ace cu gămălie. La păsările mici, cele două maxilare se imobilizează prin înfigerea unui ac de jos în sus, la cele cu ciocul mai mare acesta se leagă cu o ață trecută prin orificiile nazale. Dacă pasărea se montează cu ciocul deschis atunci se introduce între maxilare o bucată de carton.

Pentru fixarea ochilor de sticlă se udă mai întîi pleoapele cu un tampon umed de vată pentru a le reda elasticitatea pierdută prin uscare. Se taie sîrma pe care sînt fixați ochii păstrînd doar 2—3 mm din ea. Se pune cîte o picătură de clei pe vata din orbite și se așează fiecare ochi presînd ușor cu degetul pînă ce fața bombată a acestuia se găsește la nivelul pleoapelor. Un alt procedeu recomandă scoaterea vatei din orbită și înlocuirea ei cu plastilină, pe care se fixează ochiul. Peste ochi se așează pleoapele. Ochii de sticlă trebuie să respecte mărimea și culoarea celor naturali.

Pasărea se lasă în această poziție timp de două săptămîni, ferită de surse de căldură și de soare. După uscare se scot bandajele de carton, acele, sîrmele de susținere. Dacă ciocul și picioarele s-au decolorat prin uscare se vopsesc în culoarea naturală cu vopsea în ulei sau acuarelă.

După finisare, piesa naturalizată, se etichetează. Eticheta va indica denumirea științifică și populară a speciei, sexul, data, locul colectării și numele colectorului.

5.5.6. ÎMPĂIEREA MAMIFERELOR MICI ȘI MIJLOCII

După dimensiunile corpului mamiferele sînt grupate în 3 categorii : mici, mijlocii și mari. Tehnica de lucru fiind mai complicată la speciile mari nu o vom prezenta în acest capitol.

Mamiferele mici și mijlocii se colectează prin împușcare sau prin capturare la capcane sau curse. Animalele vii se sacrifică prin narcotizare cu cloroform și eter.

Cele vînate sau prinse la capcane și curse pentru a fi bune de împăiat trebuie să îndeplinească următoarele condiții :

— să fie proaspete (părul de pe abdomen să fie rezistent și să nu se desprindă ușor) :

— să aibă pielea cît mai intactă.

Urmele de sînge sau de altă natură de pe blană se spală cu apă caldă și săpun. Pielea se usucă cu un aparat electric, cu aer (de ex. un phön) sau cu un praf absorbant (amidon).

Înainte de a începe împăierea se stabilesc cîteva date necesare atît completării etichetei, cît și pentru respectarea dimensiunilor cînd se confecționează corpul artificial. Se va nota :

— culoarea ochilor și a părților lipsite de peri ;

— lungimea corpului (de la vîrful botului pînă la baza cozii) (fig. 193/1) ;

— lungimea cozii (de la baza ei pînă la vîrf, fără smoc de peri) (fig. 193/2) ;

— lungimea urechii (de la baza deschiderii pînă la vîrf) (fig. 193/3);
— lungimea labei posterioare (de la extremitatea călciiului, pînă la vîrful degetelor, fără gheare) (fig. 193/4);
— greutatea animalului.

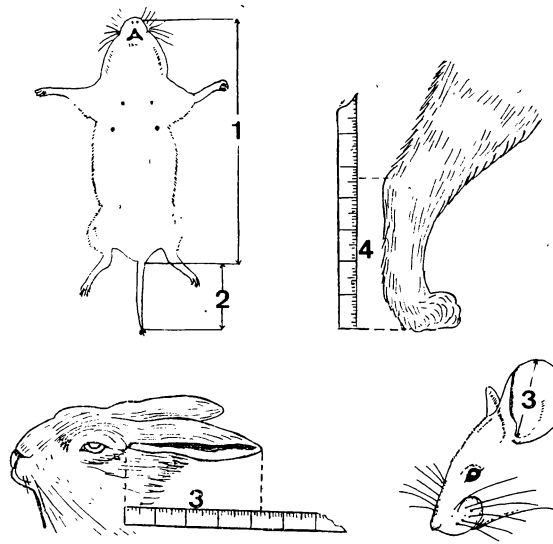


Fig. 193. Dimensiunile corpului la un mamifer: 1. lungimea corpului; 2. lungimea cozii; 3. lungimea urechii la şoarece şi la iepure; 4. lungimea labei posterioare.

Jupuirea. Modul de jupuire diferă de la specie la specie în funcţie de talia animalului. Pentru a nu murdări blana în timpul lucrului, prin scurgerea conţinutului intestinal, se iau măsuri de prevenire introducînd un tampon de vată în esofag, prin orificiul bucal şi altul în rect, prin orificiul anal.

Se aşează animalul pe planşeta de lucru în decubitus dorsal. Se face o cărare pe linia medio-ventrală, dînd părul de-o parte de pe linia de disecţie. Cu un bisturiu cu lama bine ascuţită sau cu o lamă

de ras se secționează pielea, de la marginea posterioară a apendicelui xifoid pînă aproape de orificiul anal, ferind organele genitale. La animalele de talie mijlocie se prelungește tăietura către vîrful cozii. Se ridică marginile tăiate în dreptul membrelor posterioare și se începe jupuirea pe o parte și pe alta a corpului. Pe măsură ce se dezvăluie musculatura se pun straturi de vată pentru a evita murdărirea perilor de pe corp și lipirea lor. Se degajează mai întîi membrele posterioare. Acestea se împing spre tăietura de pe abdomen iar cu un clește sau bisturiu se secționează la nivelul articulației tibio-femurale. Se trage coada din învelișul ei tegumentar și se continuă jupuitul trenului posterior al corpului. Se răsfrînge pielea și se continuă desprinderea ei pînă se ajunge la nivelul membrelor anterioare. Acestea se detașează de corp la nivelul articulației scapulo-humerale. Apoi se trage pielea de pe gît pînă la baza craniului. Desprinderea pielii de pe cap se face mai greu deoarece ea aderă foarte strîns la țesuturile subiacente.

Pentru a nu deteriora pielea trebuie să se țină seama de următoarele indicații :

— urechile speciilor mici nu se jupoaie ci se detașează de la baza pavilioanelor, cît mai aproape de substratul osos ;

— în regiunea ochilor pielea se desprinde în jurul orbitelor, încît pleoapele să rămînă intacte ;

— buzele se detașează cît mai aproape de maxilare, iar cartilajul nazal se taie la nivelul septului nazal.

Se detașează capul de trunchi la nivelul articulației vertebrei cervicale cu condilii occipitali. Se curăță bine oasele craniului după indicațiile date la prepararea scheletelor.

Urmează jupuirea membrelor desprinzînd pielea pînă la degete, după care se curăță oasele fără a deteriora ligamentele. Apoi se trag înapoi în piele.

La mamiferele de talie mijlocie jupuirea se termină cu desprinderea pielii de pe fața externă a urechilor pînă la marginea pavilioanelor. Se crestează buzele pe fața internă pentru a favoriza pătrunderea soluției conservante, cu care se tratează pielea.

Prepararea pielii. Operațiunea constă în curățarea acesteia (pe fața internă) și tratarea ei cu substanțe chimice care să-i conserve elasticitatea, rezistența și durabilitatea părului.

În acest scop, pielea proaspăt jupuită se întoarce pe dos și se curăță prin răzuire cu bisturiul sau cu un cuțit cu lama ascuțită, îndepărtînd resturile de mușchi, grăsime și cheaguri de sînge.

La mamiferele mici imediat după curățare, toată suprafața internă a tegumentului se presară cu sare și alaun în părți egale. Apoi se întoarce pielea cu blana în afară și se lasă astfel 24 de ore, timp în care să se realizeze pătrunderea sărurilor în grosimea tegumentului. După aceea, se înlătură amestecul de săruri rămase și se pensulează pielea cu o soluție de arseniat de sodiu.

La mamiferele de talie mijlocie acest tratament nu este satisfăcător. După curățarea pielii aceasta se introduce într-un vas de sticlă sau smălțuit ce conține soluție de sare și alaun în următoarea proporție : 1 l apă, 50 g sare și 50 g alaun. După ce a stat în soluție 2—3 zile,

pielea se scoate și se răzuie pentru subțiere și uniformizare. Se introduce încă odată în soluție și se lasă tot 2—3 zile. Pielea scoasă din baia cu săruri se spală cu multă apă, mai ales blana pentru a nu se forma cristale pe peri, după uscare. Apoi se stoarce bine și se întinde cu blana către interior pentru a o unge cu arseniat de sodiu. Cu aceeiași soluție se pensulează și oasele rămase atașate la tegument.

Confecționarea corpului artificial. Se pregătesc mai întîi sîrmele de susținere a corpului. Se taie și se ascut la ambele capete 6 bucăți de sîrmă : una pentru susținerea trunchiului și a capului, 4 pentru membre și una pentru coadă. Grosimea lor depinde de lungimea și greutatea animalului, de poziția pe care i-o imprimăm. Lungimea sîrmelor o va depăși pe cea a pieselor pe care le susțin (trunchi, membre, coadă) avînd în vedere că extremitățile lor trebuie să rămînă libere pentru fixare.

Materialul din care se prepară trunchiul la mamifere se alege în funcție de poziția în care va fi montat animalul. Mai întîi se ia sîrma de susținerea trunchiului și i se dă forma corespunzătoare. În jurul ei se înfășoară materialul de umplere (talaș, cîlți, etc.) care se strînge cu ață rezistentă sau sfoară. Se modelează pînă ce ia dimensiunile și forma trunchiului natural. Tot din vată sau cîlți se confecționează și mușchii gîtului. Capătul liber al sîrmei care va susține capul se întoarce prin orificiul occipital în cutia craniană. El va străpunge peretele osos fie în partea anterioară a maxilarului superior, fie în regiunea parietală, unde se fixează în formă de scoabă.

Se trece apoi la prepararea și fixarea craniului. Se umplu cu caolină orbitele și fosele nazale. Apoi se modelează mușchii artificiali ai capului. Se introduce vată în golurile care se mai observă și se definitivează forma musculaturii capului și a trunchiului. Este necesară o redare fidelă a structurii anatomice a corpului mai ales în cazul mamiferelor cu pielea subțire și blana scurtă, care evidențiază ușor defectele de execuție.

Înainte de a confecționa mușchii artificiali ai membrelor, se întăresc oasele rămase atașate la piele, cu sîrmele de susținere. Se introduce în fiecare picior, paralel cu axul osos, cîte o bucată de sîrmă, care se împinge pînă ce străpunge talpa și capătul iese în afara ei. Sîrma se leagă cu ață sau sfoară subțire, lăsînd însă articulațiile libere.

În jurul axului osos al piciorului, întărit cu sîrmă, se modelează din vată sau cîlți mușchii artificiali, avînd în vedere forma și dimensiunile naturale. Modelarea musculaturii se definitivează cu caolină, iar membrele se introduc în tegument. În jurul sîrmei ce înlocuiește coada naturală se înfășoară vată care va constitui musculatura artificială a acesteia.

Facem un ultim control pentru a verifica dacă pielea s-a întins bine pe corpul artificial. Dacă este necesar se mai fac retușări introducînd vată sau cîlți în golurile ce apar. Se apropie marginile tăieturii tegumentului și se coase la fel ca și la păsări. În cazul mamiferelor de talie mijlocie (de ex. iepure) unde s-au făcut secțiuni și pe fața internă a picioarelor se cos mai întîi aceste tăieturi și apoi cea de pe abdomen.

Dacă animalul se montează cu gura închisă atunci se cos și buzele, avînd grijă să nu se vadă cusătura.

Montarea. Fixarea animalului se face pe un suport de lemn vopsit sau lăcuit, prevăzut cu găuri. Pe acest postament se pot aranja elemente din mediul în care trăiește specia, căreia îi aparține animalul. De ex. un popîndău se montează pe un suport pe care am fixat spice de grîu, sau tufe de iarbă caracteristice zonei de stepă. O veveriță se poate monta pe o creangă de alun avînd în vedere că alunele constituie hrana preferată a acestui rozător.

După ce animalului i s-a dat poziția caracteristică definitivă se așează pe postament. Sîrmele picioarelor se trec prin găurile postamentului apoi se îndoaie în formă de scoabă, dedesubtul acestuia.

Se introduc ochii artificiali în orbite, se aranjează pleoapele peste globul ocular și se prind cu ace. Urechilor li se dă o poziție cît mai corespunzătoare, iar pentru susținere se prind între bucăți de cartoane care se fixează cu ace. Se mai poate folsi caolina, care se aplică în strat pe partea internă a pavilioanelor. Dacă urechile sînt mari, ca la iepure, ele pot fi susținute chiar de sîrme.

Cînd animalul se montează cu gura deschisă se controlează dentiția, dacă dinții sînt toți și bine înfipți în alveole. Dacă se mișcă se întăresc cu clei sau aracet. Se modelează gingiile și interiorul cavității bucale folosind gips amestecat cu clei sau dextrină. Limba se confecționează dintr-un mic săculeț de pînză umplut cu caolină, gips cu clei, sau alt material de modelat. Acesta se lipește cu un capăt în fundul cavității bucale. Se alipesc buzele de gingii și se fixează cu ace.

Urmează aranjarea blănii, care se piaptănă cu un piepten (de preferat de metal) dacă perii sînt lungi sau se perie dacă aceștia sînt scurți.

Astfel preparată piesa se lasă la uscat timp de 2—3 săptămîni, într-un loc ferit de lumina solară și de sursă de căldură. După uscare se scot toate suporturile improvizate (cartoane, ace, sîrme) folosite pentru susținere temporar. Se vopsesc părțile glabre ale corpului (botul, marginea pleoapelor, etc.) și cavitatea bucală (dacă gura este montată deschisă) în culori cît mai naturale.

După ce s-au terminat toate aceste operații se lipește eticheta de postamentul de lemn. Ea conține toate datele necesare : numele științific și popular al speciei, sexul, locul data colectării și numele colectorului.

5.6. CONFECȚIONAREA MICRODIORAMELOR

Organizarea dioramatică a muzeelor de științe naturale este o prioritate românească, Grigore Antipa fiind primul care a introdus încă din 1907, diorama ca mod de redare veridică a unui colț din natura vie.

Dacă scena de viață este reprezentată în miniatură folosind toate elementele floristice și faunistice la o scară mică, complexul rezultat poartă denumirea de microdiorama. Acest microcomplex poate fi realizat mai ușor în școli.

Biologul care realizează microdiorama trebuie să fie un bun cunoscător al naturii, a vieții animalelor și plantelor. El trebuie să aibă în vedere aspectul veridic al prezentării și să nu înlocuiască valoarea științifică a complexului cu aspectul său atrăgător. Microdioramele trebuie

să sugereze privitorului unitatea indisolubilă a materiei, componența unor ecosisteme, lanțurile trofice, necesitatea protecției mediului și a folosirii raționale și adecvate a resurselor naturii.

Confecționarea vitrinelor. În cazul microdioramelor se pot folosi pentru confecționarea vitrinelor cutii de lemn de formă dreptunghiulară cu peretele din față din sticlă. Se pot construi vitrine și cu ceilalți pereți din sticlă, cu excepția celui din spate, care rămîne din placaj. Pe acesta se pictează o imagine de fundal corespunzătoare temei propuse.

Confecționarea solului artificial. Pentru obținerea solului artificial, substratul necesar al microdioramei, se folosește nisip mărunt care se îmbibă cu clei de tîmplărie lichid. Se amestecă cu o lopățică sau cu mîna (într-un vas sau o lădiță) pînă se obține o masă omogenă, care se întinde pe fundul vitrinei. În acest substrat se vor fixa elementele vegetale. După uscarea substratului acesta se poate colora în diferite nuanțe de vopsea fie prin pulverizare fie prin pensulare.

Substratul microdioramei poate fi confecționat din mușchi și lichen. Pentru a-i putea monta se udă mai întîi cu apă. Partea bazală se introduce în clei lichid și se presează pe podeaua vitrinei. Pentru a fi siguri că se realizează o bună aderență se unge cu clei și locul unde vrem să lipim mușchii și lichenii. După uscarea mușchilor, care durează 5—10 zile, ei pot fi colorați cu culori de anilină, acuarele sau tuș colorat, folosind un pulverizator. Este de preferat să se pulverizeze diferite nuanțe de verde, galben sau cafeniu. Se mai lasă 2—3 zile pentru uscarea vopselei care este fixată apoi cu o soluție de lac de terebentină. Lichenii își păstrează în general culorile, dar pot fi și ei pulverizați ușor pentru a le împrospăta culorile.

În cazul unor microdiorame se poate reda reliefuł prin folosirea papier-maché-ului (mucava). Acesta este un material bun pentru modelat, care se poate prepara cu ușurință. Are în compoziția sa următoarele componente : 600 g hîrtie mărunțită, 800 g clei de tîmplărie, 200 g ulei de in fiert, 400 g dextrină și 3.200 g praf de cretă. Hîrtia mărunțită se amestecă cu apă, după care se fierbe. Se amestecă și în timpul fierbului pentru a nu se forma cocoloașe. Coca obținută, după ce se stoarce, se amestecă cu dextrină și clei iar peste ea se toarnă praful de cretă și uleiul de in fiert (dacă nu se poate procura se renunță la ultimul ingredient). Se obține un aluat care se folosește imediat, căci se întărește repede. Bucățile uscate de amestec se pot refolosi fierbîndu-se în apa în care se va dizolva cleiul.

Montarea diverselor elemente în microdioramă. După confecționarea vitrinei, pictarea peretelui din spate și realizarea solului artificial, se trece la montarea diverselor elemente ale microdioramei. În substratul de nisip întins pe podeaua vitrinei se fixează încă înainte de uscarea acestuia materialul vegetal colectat și uscat anterior acestei operații.

Gramineele uscate și colorate cu culori dizolvate în terebentină se fixează de podea în mănunchiuri, legîndu-se cu ață în culoare. Pentru vegetația de pădure, cu specii mai variate, nu se recomandă gruparea în mănunchiuri.

Ultima operațiune constă în montarea animalelor naturalizate. Într-o diorama care va reda viața într-o baltă se vor monta specii de pești și amfibieni alături de moluște, insecte acvatice și alte nevertebrate.

Pentru reptile trebuie avut în vedere faptul că defectele de naturalizare ies mai ușor în evidență și de aceea este necesară o atenție mai mare la prepararea lor. Montajul lor se face pe nisip, pe pietre mai mari sau pe ramuri.

Păsările sînt cel mai frecvent folosite în alcătuirea microdioramelor pentru a ilustra fie un colț de pădure, fie de baltă. Acestea se montează prin fixarea sîrmelor de la picioarele lor. Dacă pasărea stă pe sol sîrmele se camuflează cu vegetația ierboasă. Dacă păsările se plasează pe ramuri atunci sîrmele se fixează de acestea. Încă de la naturalizare este necesar să li se imprime păsărilor o anumită poziție corespunzătoare scopului propus. Pentru poziția de zbor se înfig sîrme cu un capăt în corpul păsării, iar cu altul într-o ramură de copac. Se mai pot fixa cu sîrme subțiri de tavanul dioramei. Sîrmele se vor vopsi în culoarea fundalului. Păsările mai pot fi montate pe cuib sau lîngă cuib. Cuiburile de ochiul boului, de potîrniche, prepeliță, găinușă de munte sau de rață se fixează direct pe sol folosind niște sîrme ascuțite. Dacă se pun ouă în cuib acestea se golesc de conținut. În acest scop se perforează coaja oului cu un instrument ascuțit. Prin orificiul făcut se introduce aer cu seringa care va determina golirea oului de conținut. Operația se face deasupra unui cristalizor. Se spală apoi cu apă interiorul oului și se pune la uscat. Orificiul se astupă cu un dop de vată. Oul se așează în cuib cu locul perforat în jos.

Cuiburile de pescăruși cu ouă sau cu pui mici sînt de asemenea instructive. Cuiburile situate pe ramuri de copaci se iau cu o parte din suportul lor natural, iar ansamblul se fixează de pereții laterali ai microdioramei folosind cuiele. Manipularea cuiburilor trebuie făcută cu atenție, deoarece multe dintre ele sînt construcții delicate, care se pot deteriora.

Mamiferele mici se montează pe suporturi care introduse în vitrină se camuflează cu pietre, nisip, mușchi și licheni. Încă de la naturalizare, acestora li se imprimă o anumită expresie cît mai fidelă celei reale. Mamiferele mici ce duc viață subterană pot fi prezentate în galerii secționate, în așa fel încît să se observe aspectul exterior al acestora, dar și compartimentarea, camera cuib și ieșirile adăpostului. Realizarea acestui ansamblu necesită uneori o construcție prealabilă din placaj sau carton. Tot montajul se acoperă cu nisip și clei. După uscare totul se colorează reproducînd cît mai exact culorile naturale. La suprafața se poate fixa vegetație.

6. TEHNICA CONFECȚIONĂRII PREPARATELOR MICROSCOPICE DE STRUCTURI ANIMALE

Confecționarea preparatelor microscopice reprezintă „rațiunea de a fi" a histologiei, disciplină biologică care relevă structura fină a diverselor tipuri de țesuturi din organismul animal.

Cea mai uzitată tehnică pentru obținerea unor asemenea preparate este tehnica secțiunilor în parafină, care conferă structurilor indici de refracție diferiți și prin aceasta, contrast și deci o puternică vizualizare.

Tehnica menționată presupune efectuarea unui întreg lanț de operații care se succed cu strictețe și cărora este absolut obligatoriu să li se acorde cea mai mare atenție ; în caz contrar preparatul este ratat și prin urmare impropriu observației microscopice.

Operațiile sînt următoarele :

1. sacrificarea animalului ;
2. recoltarea organului sau a fragmentelor de organe vizate pentru studiu ;
3. fixarea ;
4. deshidratarea ;
5. clarificarea ;
6. impregnarea cu parafină ;
7. incluzionarea ;
8. secționarea ;
9. întinderea secțiunilor pe lamă ;
10. uscarea secțiunilor pe lamă ;
11. deparafinarea ;
12. hidratarea ;
13. colorarea ;
14. deshidratarea ;
15. clarificarea ;
16. montarea.

1. *Sacrificarea* animalelor — executată totdeauna cît de gentil posibil pentru a evita traumatismele cu consecințe nefaste asupra structurilor, se face diferențiat, în funcție de talia lor ; astfel, broasca, șopîrla se paralizează (fig. 229—230), deci se înțeapă regiunea bulbară și se distruge măduva spinării, iar păsările și mamiferele se anesteziază cu cloroform sau eter sub un recipient bine închis. În ambele situații animalele devin inerte și se fixează în ace cu gămălie, pe placa de plută sau în chiuveta de disecție.

2. *Recoltarea* fragmentelor se face după disecarea foarte atentă și cît mai rapidă a animalului, pentru a se evita astfel alterarea țesuturilor.

3. *Fixarea* fragmentelor de organe sau țesuturi (cît mai mici, pentru a pentra fixatorul — 5—6 mm) — astfel prelevate, se face în fixatori — mixturi lichide de diverse substanțe chimice — care să conserve structurile cît mai aproape de starea „in vivo", deci cu păstrarea morfologici și arhitectonicii celulare normale; de regulă, fixatorii precipită proteinele (ucid celulele și blochează reacțiile enzimatice, împiedicînd autoliza) și dizolvă lipidele, conferind un anumit grad de consistență fragmentelor, indispensabil prelucrării lor ulterioare.

O fixare „ideală" presupune următoarele condiții :

— fixarea pieselor imediat după moartea animalului, evitîndu-se astfel autoliza ;

— utilizarea lamelor de ras pentru prelevarea pieselor și nu a foarfecelor sau penselor care pot provoca leziuni ;

— spălarea fragmentelor prelevate, de mucus sau de sînge, cu ser fizologic și nu cu apă care provoacă edeme ;

— evitarea deshidratării pieselor, prin acoperirea viscerelor cu tifon îmbibat cu ser fiziologic, ca și prin umectarea continuă a instrumentelor ;

— asigurarea unui volum mare de fixator (de 20—30 ori mai mare ca al piesei fixate) ; deci flaconul trebuie să fie larg, piesa să nu adere la pereții săi și pentru început trebuie agitat ; în cazul fixărilor îndelungi, soluția trebuie schimbată.

Fixarea pieselor se face în flacoane de sticlă cu dop rodat, cu gîtul larg și cu fundul plat pe care se pune o hîrtie de filtru în scopul asigurării contactului total cu fixatorul (fig. 194). Fragmentele de intestin, esofag sau stomac, se spală cu ser fiziologic, se leagă la un cap, iar prin celălalt se introduce fixatorul cu o pipetă, după care de asemenea se leagă și se așează în vasul de fixare. Mezenterul, epiploonul, prinse în ace se întind pe o bucată de carton și se scufundă în fixator. Mușchii, nervii, se leagă la capete pe cîte un bețișor și astfel se pun în fixator.

Există fixatori citologici și fixatori histologici, dintre care, vom menționa pe cei mai uzitați ; primii conservă celulele și țesuturile întocmai ca „in vivo" ; ei conțin acid osmic, bicromat de potasiu, acid cromic etc. Astfel, pentru evidențierea mitocondriilor și a complexului Golgi, se utilizează următorii fixatori :

Fixatorul Champy

— soluție apoasă de bicromat de potasiu 3% 7 ml
— soluție apoasă de acid osmic 2% . . . . 4 ml
— soluție apoasă de acid cromic 1% . . . . 7 ml

Fixarea se face la gheață 24—28 ore, după care piesele se spală alte 24 ore la curent de apă, o oră în apă distilată și ulterior se continuă tehnica obișnuită (deshidratare etc.).

Fixatorul Benoit

— soluție apoasă de bicromat de potasiu 5% 6 ml
— soluție apoasă de acid osmic 2% . . . . 2 ml
— soluție apoasă de biclorură mercurică 5% 5 ml
— soluție apoasă de azotat de uraniu 4% 4 ml

Fixarea se face la temperatura camerei timp de 24 ore.

Fixatorul Regaud

— soluție apoasă de bicromat de potasiu 3% 80 ml
— formol 40% . . . . . 20 ml

Fixarea se face între 1—6 zile cu schimbarea zilnică a soluției; apoi piesele se trec pentru 1—4 săptămîni în soluție de bicromat de potasiu 3%, în scopul unei mai bune evidențieri a mitocondriilor.

Fixatorul Carnoy

— alcool absolut 100% . . . . . 60 ml
— cloroform . . . . . 30 ml
— acid acetic glacial . . . . . 10 ml

Fixarea durează 1—3 ore, urmată de deshidratarea cu alcool absolut. Amestecul fixează bine nucleul și conservă glicogenul din citoplasmă.

Fixatorii histologici produc artefacte, adică structuri neexistente „in vivo", datorită violenței cu care pătrund în țesuturi; ei conțin acid picric, acid acetic, formol, alcool; cei care conțin acid picric impun ca după deparafinare, secțiunile să fie foarte bine spălate cu alcool de 96 pînă la decolorarea completă.

Fixatorul Bouin

— soluție apoasă suprasaturată de acid picric 15 ml
— formol 40% . . . . . 5 ml
— acid acetic glacial . . . . . 1 ml

Fixarea durează 24—48 ore, pînă la cîteva zile.

Fixatorul Bouin-Hollande care este și un decalcifant conține:

— acetat de cupru neutru . . . . . 2,5 g
— apă distilată . . . . . 100 ml

După ce se dizolvă la rece se adaugă:

— acid picric . . . . . 4 g
— formol 40% . . . . . 10 ml
— acid acetic glacial . . . . . 1,5 ml

Fixarea durează 24—48 ore.

Fixatorul Helly

— biclorură mercurică . . . . . 5 g
— bicromat de potasiu . . . . . 2,5 g
— sulfat de sodiu . . . . . 1 g
— apă distilată . . . . . 100 ml
— formol . . . . . 10 ml

(numai în momentul folosirii)

Fixarea durează 24 ore. De atenționat faptul că înainte de colorare, sublimatul se scoate din secțiuni cu soluție alcoolică de iod metalic, urmînd tratarea cu soluție apoasă de hiposulfit de sodiu 5%, pînă la decolorarea completă.

Fixatorul Susa

soluția mamă:

— apă distilată . . . . . 80 ml
— clorură de sodiu . . . . . 0,5 g

— biclorură mercurică . . . . . 4,5 g
— acid tricloracetic . . . . . 2 g

Din soluția mamă se iau în momentul întrebuințării 8 ml la care se adaugă :

— formol 40% . . . . . 2 ml
— acid acetic glacial . . . . . 0,4 ml

Fixarea durează 6—12 ore iar deshidratarea începe cu alcool 90.

După fixare, piesele se spală 24 ore la apă de robinet, de preferat în vase cu perforații (fig. 195). Dacă piesele fixate conțin țesut osos se

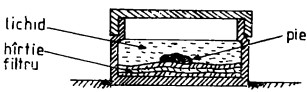


Fig. 194

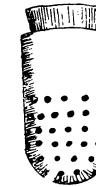


Fig. 195

impune ca după fixare și spălare, să se decalcifieze (cîteva ore pînă la cîteva zile) într-o soluție de 5% acid azotic, care se combină cu sărurile de calciu și formează compuși solubili în lichidul declacifiant ; astfel piesele devin moi. Soluția se obține astfel :

— acid azotic 61% cu greutate specifică 1,40—7,5 ml
— 100 ml apă distilată
— după decalcifiere piesele se trec în soluția apoasă 5% de alaun sau sulfat de sodiu.

Alte soluții decalcifiante sînt :

— Soluția apoasă de 5% acid tricloracetic ; spălarea ulterioară în alcool 90, 96,

— Soluția de acid clorhidric conținînd :
— 100 ml soluție saturată de clorură de sodiu
— 100 ml apă distilată
— 4—20 ml acid clorhidric

4. *Deshidratarea* (scoaterea apei din piese) trebuie făcută lent cu o substanță care să absoarbă apa din țesuturi ; așa sînt alcoolul etilic, butilic, acetona etc. Cel mai frecvent folosit este alcoolul etilic de concentrații crescînde (50, 70, 95, 100) cu schimbarea băilor din 30 în 30 minute. Durata acestei operații depinde de mărimea și natura piesei ; pentru piesele de 5 mm grosime ea durează 2—3 ore.

5. *Clarificarea* constă în scoaterea alcoolului din piese și înlocuirea lui cu benzol, xilol, toluol, miscibili cu parafina în care piesele urmează a fi incluse ; la sfîrșitul acestei operații piesele sînt aproape transparente. Durata clarificării este, în general, aproximativ jumătate din timpul cît piesele au stat în alcool absolut. Băile se schimbă tot din 30 în 30 minute.

6. *Impregnarea cu parafină* a piesei se face prin trecerea ei succesivă în cîteva băi de parafină (punct de fuziune 45—60 grade, în etuvă la 58°C) cu scopul scoaterii totale din piesă a solvenților.

Durează în medie cîteva ore dar poate atinge 24 ore fără riscuri.

7. *Incluzionarea* pieselor se face în felul următor :

— pe un dreptunghi de sticlă foarte curată și încălzită se așează — după necesități — două bare metalice în formă de L (Leuckart) (fig. 196).

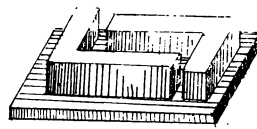


Fig. 196

În spațiul dintre ele se toarnă parafină lichidă în care apoi cu o spatulă de asemenea caldă se așează piesele orientîndu-le în vederea secționării, conform scopului urmărit, topografie pe care o schițăm pe o foaie de hîrtie deoarece ulterior, cînd fasonăm piesele cu bisturiul să le recunoaștem cu ușurință. Fasonarea are drept scop obținerea din fiecare piesă inclusă, a unui trunchi de piramidă cu laturile și bazele perfect paralele.

8. *Secționarea* pieselor în felii de regulă de 6—7 microni se face în felul următor : piramida este lipită cu baza mare pe portobiectul microtomului (prin încălzirea parafinei de pe portobiect cu o spatulă, evident fierbinte). Portobiectul se fixează apoi la microtom, astfel încît piesa să fie paralelă cu briciul. Se fixează grosimea secțiunilor din dispozitivul special al microtomului. Se rotește manivela și astfel secțiunile se obțin în bandă de parafină care cu o pensulă foarte fină se așează pe un carton negru, pentru contrast.

9. *Întinderea secțiunilor pe lamă*

Pe mijlocul lamei de sticlă foarte curată și degresată se pune o picătură de albumină Mayer (părți egale de albuș de ou filtrat și glicerină) care se întinde în strat uniform, cît apreciem că vor ocupa secțiunile (fig. 197). Se taie cu bisturiul un număr de secțiuni (în funcție de dimensiunile lamelei de sticlă) și se așează în șiruri ordonate. La marginea secțiunilor se picură cu o pipetă, soluție de gelatină (apă distilată în care s-a dizolvat puțină gelatină). Lama cu secțiunile se pune pe o platină electrică încălzită la 40 grade astfel încît parafina se dilată și odată cu aceasta secțiunile se întind perfect ; după răcirea lamei excesul de lichid se scurge, iar secțiunile se ordonează simetric cu ajutorul unor ace (Fig. 198).

10. *Uscarea secțiunilor*

Lamele cu secțiuni se pun la uscat timp de 24 ore la temperatura camerei sau la etuvă (37 grade).

11. *Deparafinarea* reprezintă operația prin care parafina este scoasă din secțiuni ; aceasta se realizează prin trecerea succesivă a lamelor cu secțiuni prin 2—3 băi (a 2—3 minute fiecare), de xilol, toluol sau benzol.

12. *Hidratarea* secțiunilor se face prin introducerea lamelor în două băi de alcool 95, o baie alcool 70 și o baie de apă distilată.

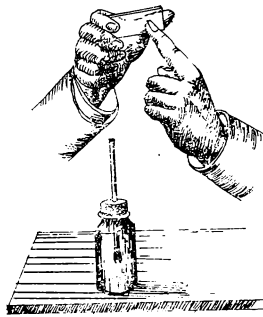


Fig. 197.

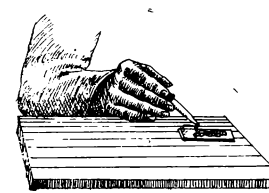


Fig. 198.

13. *Colorarea* secțiunilor diferă în funcție de ceea ce urmărim să evidențiem în ele; ea se face în vase speciale, Laveran (Fig. 199) cu coloranți histologici naturali (ex. hematoxilină, carmin etc.) sau sintetici (eozina, albastrul de metilen etc.) care definesc cromatic structurile, dar există și coloranți care definesc chimic structurile, caz în care se uzitează metode speciale histochimice. Operațiile 11, 12, 13 se fac în pahare Borell (fig. 200).

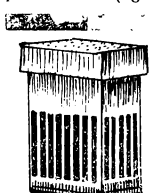


Fig. 199

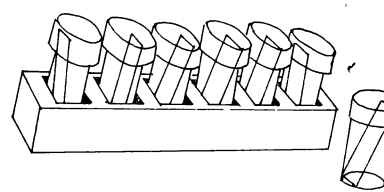


Fig. 200

14. *Deshidratarea* se face în băi succesive de alcool 95 și 100 care scot apa din secțiuni (Fig. 201).

15. *Clarificarea* se face în 3 băi de xilol (3 minute fiecare) (Fig. 202).

16. *Montarea secțiunilor:* pe secțiuni se pune o picătură de balsam de Canada sau altă rășină cu indice de refracție apropiat de cel al sticlei și se acoperă cu lamela de sticlă.

Coloranții pot fi bazici (ex. hematoxilina, albastrul de metilen), acizi (ex. eozina) și neutri (ex. eozinatul de albastru de metilen). Există metode generale de colorare și metode speciale.

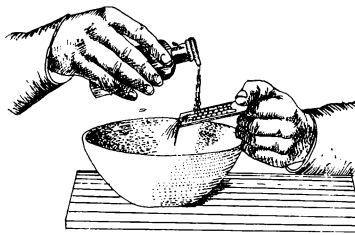


Fig. 201

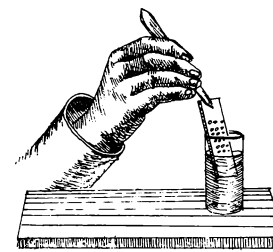


Fig. 202

Dintre metodele generale de colorare menționăm pe cele mai frecvent uzitate :

Metoda hematoxilină-eozină

reactivi necesari :

1. hematoxilină ferică 0,5 (în amestecul alcool 96 (10 ml) și apă distilată (90 ml) se dizolvă hematoxilina ferică). Soluția se maturează 4—5 săptămîni în contact cu aerul. Cînd este folosită se diluează cu apă în proporții egale.

2. soluție de alaun de fier și amoniu

apă distilată 100 ml

Se dizolvă alaunul de fier și amoniu (cristale violete) — 10 g în apa distilată. Soluția se diluiază cînd este folosită la diferențiere.

3. soluție apoasă de eozină 0,5%.

Tehnica de lucru

— deparafinarea și hidratarea secțiunilor ;

— mordansarea lor cîteva ore în alaun de fier și amoniu 2,5% (mordansantul mărește afinitatea țesutului pentru colorant) ;

— spălare cu apă distilată ;

— colorare cu hematoxilină de la cîteva ore la 24 ore ;
— spălare cu apă distilată ;
— diferențierea în alaun diluat cu apă distilată, în proporții egale (se face sub microscop, urmărindu-se decolorarea structurilor, cu excepția nucleilor care trebuie să rămînă colorați) ;
— spălare o oră cu apă de robinet ;
— spălare cu apă distilată ;
— colorarea cu eozină 30 minute ;
— spălare cu apă distilată ;
— deshidratare și clarificare ;
— montare în balsam de Canada.

Rezultat : nucleii apar în albastru închis, citoplasma și țesutul conjunctiv în roșu.

Metoda Azan

reactivi necesari :

1. Orange
— orange G. . . . . 2 g
— apă distilată . . . . . 100 ml
— acid fosfomolibdenic . . . . . 1 g
2. Albastru de anilină
— albastru de anilină . . . . . 0,5 g
— apă distilată . . . . . 100 ml
— acid acetic glacial . . . . . 8 ml
se fierbe puțin și se filtrează amestecul.
3. Carmin (Azocarmin)
— carmin . . . . . 0,1 g
— apă distilată . . . . . 100 ml
se fierb cel mult 5 minute. Se lasă să se răcească la temperatura camerei, se filtrează și se adaugă 1% acid acetic.
4. Alcool anilinat
— alcool de 90
— ulei de anilină 1‰
5. Alcool acetic
— alcool de 96 la care se adaugă 1% acid acetic
6. Acid fosfomolibdenic 5%

Tehnica de lucru :

— deparafinarea și hidratarea secțiunilor ;
— mordansarea în alcool anilinat timp de 15 minute în vase Petri. Lamele trebuie să fie acoperite complet cu alcool anilinat ;
— colorare cu carmin încălzit în etuvă la 58—60° timp de 30 minute și încă 10 minute la temperatura camerei ;
— spălare cu apă distilată ;
— diferențiere cu alcool anilinat. Aceasta se face fie punînd alcoolul pe lamă, fie în vase Petri. Se scot lamele și se controlează la microscop pînă cînd nucleii sînt bine colorați ;
— spălarea pe lamă cu alcool acetic de 3 ori ;
— spălare bine cu apă distilată ;

— colorarea secțiunilor cu Orange G., timp de 10 minute;
— spălat scurt cu apă distilată;
— se toarnă pe lamă acid fosfomolibdenic timp de 5 minute;
— se înlătură acidul fosfomolibdenic, se șterg lamele și se usucă secțiunile prin presare cu hîrtie de filtru uscată;
— colorarea cu albastru de anilină timp de 30 minute;
— spălare cu alcool de 96;
— deshidratarea și clarificarea secțiunilor;
— montarea în balsam de Canada.

Rezultatul colorației: nucleii celulelor sînt colorați în roșu, fibrele musculare striate în galben, fibrele conjuctive în albastru.

Metoda tricromică Masson:

Reactivi necesari:

1. Hematoxilina Regaud
   hematoxilină ferică cristale . . . . . 1 g
   apă distilată . . . . . 80 ml
dizolvarea se face la cald. După răcire se adaugă:
   alcool de 96 . . . . . 10 ml
   glicerină neutră . . . . . 10 ml
2. Fuxina
   fuxină acidă . . . . . 1 g
   apă distilată . . . . . 200 ml
   acid acetic cristalizabil . . . . . 1 ml
3. Alaun de fier, soluție 5%
4. Soluție de acid fosfomolibdenic 1%
5. Soluție de apă acetifiată 2,5%, cu albastru de anilină la saturație.
6. Apă acetifiată 1%
7. Alcool absolut acetifiat 1‰.

Tehnica de lucru:

— deparafinarea și hidratarea secțiunilor

— mordansarea în soluție de alaun de fier amoniacal 24 ore la temperatura camerei, sau 30′ la etuvă la temperatura de 50° C.

— spălare rapidă cu apă distilată

— colorarea cu hematoxilina Regaud, 24 ore la temperatura camerei, sau 30′ la etuvă la temperatura de 50°C

— spălare cu apă distilată

— diferențierea în soluție de alaun de fier 5% sau soluție saturată de acid picric în alcool de 96. Diferențierea se face la microscop pînă cînd nucleii rămîn colorați în negru intens, iar fondul preparatului rămîne necolorat.

— spălare în apă distilată

— colorare timp de 5′ în soluție de fuxină

— spălare în apă distilată

— diferențiere timp de 5′ în soluția de acid fosfomolibdenic 1%

— secțiunile, fără să fie spălate, se colorează timp de 3′—5′ în amestecul apă acetifiată 2,5% și albastru de anilină la saturație

— spălare în apă distilată

— diferențiere în apă acetifiată 1%, 3′—5′

— spălare rapidă cu alcool absolut acetifiat 1%

— deshidratare, clarificare
— montarea în balsam de Canada.

Rezultatul colorației: nucleii sînt colorați în negru, citoplasma în roz, fibrele musculare și sîngele în roșu, țesutul conjunctiv în albastru.

Metoda Giemsa:

Reactivi necesari:

1. Soluție Lugol
   iodură de potasiu . . . . . 2 g
   iod metalic . . . . . 1 g
   apă distilată . . . . . 200 ml

Soluția se prepară dizolvînd iodura de potasiu într-o cantitate foarte mică de apă. Se dizolvă apoi iodul metalic în această soluție și apoi se completează cu apă, pînă la 200 cmc.

2. Soluția Giemsa

3. Diferențiator — hichidul Gothard
   creozot pur . . . . . 50 ml
   xilol . . . . . 50 ml
   ulei cajeput . . . . . 40 ml
   alcool absolut . . . . . 150 ml

Tehnica de lucru:

— deparafinare și hidratarea secțiunilor
— tratarea secțiunilor cu soluție Lugol 24 ore
— spălare în apă distilată
— decolorarea secțiunilor pînă devin complet albe, într-o soluție apoasă de hiposulfit de sodiu 5%
— spălare în apă distilată
— colorarea secțiunilor timp de 24 ore cu soluție Giemsa (la o cantitate de apă suficientă pentru acoperirea secțiunilor, se adaugă din soluția concentrată Giemsa pînă cînd apa capătă o culoare intensă ca cerneala)
— spălare în apă
— se trec secțiunile foarte rapid (cîteva secunde) în alc. 96
— diferențierea secțiunilor în lichidul Gothard (este foarte util ca, din timp în timp, să oprim diferențierea, spălînd secțiunile cu xilol și să controlăm la microscop)
— oprirea diferențierii prin trecerea secțiunilor prin două băi de xilol
— se trec secțiunile apoi pentru 24 ore în xilol
— montarea secțiunilor în ulei de cedru.

Rezultatul colorației: nucleii albastru-violet, citoplasma roză, țesutul conjunctiv roz-palid, hematiile cărămizii, granulațiile acidofile apar roșu intens iar granulațiile bazofile violet închis.

Dintre METODELE SPECIALE de colorare menționăm:

6.1. METODE PENTRU EVIDENȚIEREA CONDRIOMULUI

Metoda Cowdry

Reactivi necesari:

1. Fuxină acidă, 10—20% dizolvată în apă anilinată
2. Soluție apoasă de verde de metil 1%

Tehnica de lucru:

— deparafinarea și hidratarea secțiunilor

— colorarea la cald a secțiunilor, pe lamă, cu fuxină acidă care se filtrează înainte de întrebuințare. Lamele acoperite cu soluția de fuxină se pun pe platină încălzită pînă ies vapori. Se lasă să se răcească și se repetă operația de trei ori.

— spălare bine cu apă distilată

— diferențiere pe lamă cu soluție apoasă de verde de metil 1% (cîteva secunde)

— spălare cu alcool de 96 și urmărirea la microscop a diferențierii pînă cînd condriomul rămîne bine colorat în roșu.

— deshidratare, clarificare

— montare în balsam de Canada.

Rezultatul coloraţiei: condriomul colorat în roșu, nucleii și fondul, verzui.

Metoda Dietrich-Parat

— Fixarea pieselor se face în soluție Zenker fără acid acetic (9 vol. + 1 vol. formol).

— Postcromizare la etuvă la 37—38 grade în soluție saturată de bicromat de potasiu în apă distilată, timp de 6—48 ore (prin tatonare). Potscromizările mai lungi insolubilizează mai bine lipidele.

— Spălare 12 ore în apă de robinet.

— Deshidratare rapidă

— Incluzie în parafină.

— Secțiuni de 2—6 microni

— Colorarea secțiunilor prin metoda Cowdry (în prealabil se tratează secțiunile cu alcool iodat și tiosulfat de sodiu pentru îndepărtarea sublimatului. Colorarea se mai poate face și cu hematoxilina Heidenhain și în acest caz condriomul apare colorat în negru.

Metoda Benoit

— Fixarea 12—48 ore la ghează în flacoane cu dop șlefuit în fixatorul Benoit (BOSU).

— Spălare în apă de robinet 12—24 ore.

— În continuare tehnica de lucru este ca la metoda Dietrich-Parat.

Metoda Heidenhain

Reactivi necesari:

1. Soluție apoasă de bicromat de potasiu 3%
2. Soluție apoasă de alaun de fier amoniacal (cristale violete) 5%
3. Hematoxilina Regaud
   hematoxilină cristalizată . . . . . 1 g
   apă distilată . . . . . 80 ml

dizolvarea se face la cald, după răcire se adaugă:

   alcool 96 . . . . . 10 ml
   glicerină neutră . . . . . 10 ml
4. Soluție diluată de eozină 0,25%.

Tehnica de lucru:

— fixarea pieselor în fixatorul Regaud (soluție apoasă de
   bicromat de potasiu 3%) . . . . . 80 ml
   formol comercial . . . . . 20 ml

Fixarea se face 4—7 zile, cu schimbarea fixatorului de cîteva ori.
— spălare în apă de robinet 24 ore
— bicromizare 6—8 zile în soluție apoasă de bicromat de potasiu 3%
— spălare 24 ore în apă de robinet
— deshidratarea și clarificarea pieselor
— incluzia în parafină
— secționarea la 2—6 microni
— deparafinarea și hidratarea secțiunilor
— mordansarea secțiunilor timp de 24 ore în soluție apoasă de alaun de fier și amoniu 5%
— spălare rapidă în apă distilată
— colorare 24 ore în hematoxilină Regaud pură, sau diluată în părți egale cu apă
— spălare în apă de robinet pînă secțiunile devin negre-albăstrui
— diferențiere sub control microscopic în soluție apoasă 5% de alaun de fier amoniacal, pînă rămîn nucleii negru-intens
— spălare timp de 20—30 minute în apă curgătoare
— secțiunile pot fi colorate cu o soluție apoasă foarte diluată de eozină (acest timp poate lipsi)
— deshidratare și clarificare
— montare în balsam de Canada.

Rezultatul colorației: nucleii și condriomul în negru intens, citoplasma cenușie (sau roz palid dacă s-a colorat cu eozină) (fig. 202 a).

6.2. METODE PENTRU EVIDENȚIEREA COMPLEXULUI GOLGI

Metoda Da Fano

— Fixarea pieselor foarte mici (2—3 mm grosime) în amestecul instantaneu :

azotat de cobalt	1 g
formol neutru	15 ml
apă distilată	100 ml

Fixarea se face 3—8 ore la gheață pentru țesuturile tinere și 12—24 ore pentru țesuturile adulte.

— Spălare rapidă în două băi de apă distilată (cel mult de cîte 1' fiecare).

— Impregnarea 24—48 ore în soluție de 1,5% nitrat de argint la temperatura camerei și la întuneric

— Spălarea 2' în apă distilată

— Piesele se trec (12—24 ore) în lichidul reductor :

hidrochinonă	1—2 g
formol neutru	15 ml
sulfit de sodiu anhidru	0,5 g
apă distilată	100 ml

— Spălare în apă distilată 30'
— Deshidratare, clarificare
— Incluzie în parafină
— Secționarea la 2—6 microni

— Deparafinare
— Montarea în balsam de Canada. Înainte de montare secțiunile pot fi tratate cu clorură de aur și fixate în hiposulfit de sodiu 5%, ca la orice impregnare (acest ultim timp poate lipsi).

Rezultatul impregnării: aparatul Golgi în negru, citoplasma aurie (fig. 202 a).

Metoda Kolatchew

— Fixarea pieselor în lichidul Champy timp de 24 ore
— Spălarea în apă de robinet 12 ore
— Spălare în apă distilată o oră
— Osmificare 4, 6, 8 zile în soluție de acid osmic 2%, la întuneric, și în flacoane cu dop șlefuit, la temperatura camerei, apoi la etuvă (36—38 grade) timp de 1—2 zile. Se poate face osmificarea numai la temperatura camerei și durează 8—30 zile sau numai la etuvă (36—38 grade) timp de 3—8 zile. Dacă soluția de acid osmic se reduce (se înegrește) se va schimba
— Spălare 1/2—1 oră în apă distilată
— Deshidratare, clarificare
— Incluzia în parafină
— Secționarea la 2—6 microni
— Deparafinare
— Montare în balsam de Canada.

Rezultatul impregnării: aparatul Golgi în negru, fondul cenușiu sau gălbui.

6.3. METODE PENTRU COLORAREA ȚESUTULUI CONJUNCTIV

Metoda Mallory

Reactivi necesari:

1. Soluție apoasă de fuxină acidă 0,1%
2. Soluție apoasă de acid fosfomolibdenic 1%
3. Amestecul colorant (la cald):
   albastru de anilină . . . . . 0,5 g
   orange G . . . . . 2 g
   acid oxalic . . . . . 2 g
   apă distilată . . . . . 100 ml

Tehnica de lucru:

— deparafinarea și hidratarea secțiunilor
— trecerea secțiunilor prin alcool iodat și tiosulfat de sodiu
— colorarea cu soluția de fuxină acidă timp de 3′
— spălare scurtă cu apă distilată
— fixarea în soluția de acid fosfomolibdenic 3—5′
— spălarea cu apă distilată
— colorarea în amestecul de albastru de anilină cu orange G
— spălare în apă distilată 2′
— diferențiere în alcool 96
— deshidratare cu alcool absolut
— clarificare și montare în balsam de Canada

Rezultatul colorației: fibrele de colagen și reticulină se colorează în albastru închis, mucusul în albastru, globulele roșii în cărămiziu, țesu-

tul muscular în portocaliu. Coloraţia reuşeşte foarte bine după fixare cu sublimat. Dacă fixarea a fost în formol, Bouin, alcool, secţiunile se vor introduce înainte de colorare, cel puţin 3 ore, în lichidul Zenker sau în bicromat de potasiu 3%.

Metoda Van Gieson

Reactivi necesari :

1. Hematoxilina Weigert formată din două soluţii :

Soluţia a :

hematoxilină cristalizată . . . . . 1 g
alcool 90 . . . . . 100 ml

se utilizează după o maturare de 21—30 zile

Soluţia b :

perclorură de fier . . . . . 3,5 g
acid clorhidric comercial . . . . . 3 ml
apă distilată . . . . . 285 ml

2. Picrofuxina :

fuxină acidă soluţie apoasă 1% . . . . . 10 ml
acid picric soluţie apoasă saturată . . . . . 90 ml

3. Soluţie apoasă 1% acid acetic glacial

Tehnica de lucru :

— deparafinarea şi hidratarea secţiunilor
— colorare 3—5′ cu hematoxilina Weigert (care se prepară amestecînd în momentul întrebuinţării, părţi egale din soluţiile a şi b).
— spălare cu apă de robinet
— spălare cu apă distilată
— colorare 1—3′ cu soluţia de picrofuxină
— spălare 5′ în soluţie apoasă 1% acid acetic glacial
— deshidratare rapidă în alcool absolut
— clarificare cu xilol
— montare în balsam de Canada acid, care se prepară punînd în balsamul de Canada neutru, cîteva picături dintr-o soluţie saturată de acid salicilic în xilol.

Rezultatul coloraţiei : nucleii negri, citoplasma galben deschis, fibrele musculare, galbene, ţesutul conjunctiv, roşu aprins.

Această metodă de colorate convine în special studiului ţesutului conjunctiv. Coloraţia însă nu este prea durabilă.

6.4. METODE PENTRU EVIDENŢIEREA FIBRELOR DE RETICULINĂ

Metoda Bielschowsky

Reactivi necesari :

1. Soluţie de permanganat de potasiu 0,25%
2. Soluţie de acid oxalic 1%
3. Soluţie de azotat de argint 2%
4. Soluţie de argint amoniacal
5. Soluţia reducătoare :

formol 40% . . . . . 1 vol
apă de robinet . . . . . 9 vol

6. Soluție de clorură de aur 1% (la 10 ml se adaugă două picături de acid acetic).

7. Soluție de tiosulfat de sodiu 5%.

Tehnica de lucru:

— deparafinarea și hidratarea secțiunilor.

— trecerea secțiunilor în soluție de permanganat de potasiu timp de 3'

— spălare în apă distilată

— trecerea secțiunilor în soluție de acid oxalic timp de 5'

— spălare în apă distilată, 1—2 ore schimbînd apa de 5—6 ori

— introducerea secțiunilor în soluție de azotat de argint timp de 24 ore (se poate impregna și mai mult, dar atunci citoplasma și nucleul capătă foarte ușor (la tratarea ulterioară) o nuanță puternic brună

— scurtă scufundare în două vase cu apă distilată (3"—5"), în care se agită lamele. Dacă rămîn secțiunile prea mult timp în apă distilată, atunci nu se mai obține impregnarea fibrelor

— trecerea secțiunilor în soluție de argint amoniacal timp de 5'—10'

— înlăturarea soluției de argint amoniacal și scufundarea în două vase cu apă distilată (în ambele, să nu treacă de 5"—10")

— introducerea în soluția reducătoare

— spălare în apă de robinet 15'

— spălare în apă distilată (scurt)

— tratarea secțiunilor cu soluție diluată de clorură de aur

— fixarea într-o soluție de tiosulfat de sodiu 5% timp de 30". La o acțiune prea îndelungată, impregnarea fibrelor pierde din intensitate

— spălare în apă de robinet 1/2—2 ore

— deshidratare și clarificare

— montare în balsam de Canada.

Rezultatul colorației: fibrele de reticulină sînt intens negre, fibrele de colagen apar brune sau cenușii.

Prepararea argintului amoniacal:

— Soluție de 10% azotat de argint (preparat din Ag. nitric pur cristalizat pt. analiză)

— Hidrat de sodiu 40% (din natriu hidric pur și natriu pt. analiză)

— Amoniac (gr. specifică 0,875—0,910, pentru analiză).

Se amestecă într-o mensură de 20—25 ml (cu dop șlefuit ca să se poată agita și care se folosește numai pentru prepararea soluției de argint) 10 cmc de soluție de azotat de argint 10% și se adaugă 5 picături de hidrat de sodiu 40%, în urma cărui adaus se formează un precipitat negru-brun de oxid de argint. După aceea se va adăuga sub continuă agitare, picătură cu picătură, cu mare atenție, amoniac, pînă ce precipitatul este solubilizat, dar mai rămîn cîteva granule; se completează cu apă distilată pînă la 20 cmc. Soluția se pregătește instantaneu.

Metoda Gomori

Reactivi necesari:

1. Soluție de permanganat de potasiu 0,5—1%
2. Soluție de metabisulfit de potasiu 1—3%
3. Soluție de sulfat de fier și amoniu 2%

4. Soluție de argint amoniacal
5. Soluție de formol 1/9
6. Soluție de clorură de aur 0,1—0,2%
7. Soluție de tiosulfat de sodiu 1%
8. Soluție de hidroxid de potasiu 10%

Tehnica de lucru :

— deparafinarea și hidratarea secțiunilor
— tratarea secțiunilor cu soluție 1, 1—2′
— spălarea în apă de robinet 5′
— decolorare în soluția 2, 1′
— spălare în apă de robinet 3—5′
— sensibilizare în soluția 3, 1′
— spălare în apă de robinet 3—5′
— spălare în două vase cu apă distilată, cîte 2′
— impregnarea pe lamă cu soluția 4, 1′
— scurtă spălare cu apă distilată 5″—10″
— reducere în soluția 5, 5′
— spălarea în apă de robinet 5′
— aurire în soluția 6, cel puțin 10′
— spălare în apă distilată
— reducerea în soluția 2, 1′
— fixare în soluția 7, 1′
— spălare îndelungată în apă de robinet
— deshidratare și clarificare
— montare în balsam de Canada.

Rezultatul colorației : fibrele de reticulină apar impregnate în negru.

Prepararea soluției de argint amoniacal după Gomori. Se păstrează într-o sticlă brună două zile.

La 10 ml dintr-o soluție de nitrat de argint 10% pusă într-o mensură, se adaugă 2 ml soluție de hidroxid de potasiu 10%. Se agită. cînd se adaugă picătură cu picătură amoniac concentrat. Dacă am reușit să dizolvăm tot precipitatul (ceea ce nu este indicat) adăugăm picătură cu picătură soluția de azotat de argint, pînă ce precipitatul dispare greu Se adaugă apă distilată pînă la dublul volumului.

6.5. METODE PENTRU EVIDENȚIEREA FIBRELOR ELASTICE

Metoda colorației cu Orceină

Reactivi necesari :

1. Orceină :

orceină	0,10 g
acid azotic	2 ml
alcool 70	100 ml

2. Soluție apoasă de verde de lumină 1%

Fixarea de preferință în formol

Tehnica de lucru :

— deparafinarea și hidratarea secțiunilor pînă la alcool 70
— colorare timp de 2—24 ore cu orceină
— spălare rapidă în apă
— diferențiere în alcool 70

— spălare cu apă distilată

— colorare de fond cu soluție de verde de lumină. Se poate colora și nucleul cu hemalaun sau hematoxilină.

— spălare cu apă distilată

— deshidratare, clarificare

— montare în balsam de Canada.

Rezultatul colorației: fibrele elastice apar colorate în brun închis, iar fondul verde. Colorația de fond poate să lipsească.

6.6. METODE PENTRU EVIDENȚIEREA ȚESUTULUI NERVOS

Metoda Nissl (pentru evidențierea corpuscurilor tigroizi)

Fixator: alcool 96

Coloranți:

1. tionină 1% — sau violet de Cresil 1% sau toluidină 1%
2. diferențiator — lichidul Gothard

creozot pur	50 ml
xilol	50 ml
ulei de cajeput	40 ml
alcool absolut	150 ml

Creozotul simplu conferă o diferențiere foarte rapidă.

Tehnica de lucru:

— recoltarea fragmentelor imediat după sacrificarea animalului, sau de la om, cît mai curînd după moarte (maximum 12 ore)

— fixare (fără spălare în apă, care dizolvă tigroidul), în alcool 96, timp de 7—8 zile cu schimbîndu-se alcoolul din 3 în 3 zile

— deshidratare, clarificare

— incluzie în parafină

— secționare la 10 microni

— deparafinare, hidratare

— spălare în apă distilată

— colorare în soluția apoasă 1% de tionină, toluidină sau violet de cresil, filtrată înainte de întrebuințare. Colorația se face pe lamă care se încălzește pe platină pînă ies vaporii; apoi se lasă să se răcească. Operația se repetă de 3 ori. Colorația se poate face și la temperatura camerei timp de 6—24 ore

— spălare rapidă în apă distilată

— spălare în două băi de alcool 96

— spălare într-o baie de alcool absolut

— diferențiere, pe lamă, în lichidul Gothard (1″—3″), pînă la decolorarea dorită

— spălare într-o baie de toluol

— spălare într-o baie de alcool absolut

— clarificare în xilol

— montare în balsam de Canada.

Rezultatul colorației: fondul decolorat, ca și fibrele cu teacă de mielină. Nucleolul și membrana nucleară intens colorate. În citoplasmă neuronilor se observă substanța cromatofilă (corpii Nissl), colorați în violet, ca blocuri colțuroase de mărimi diferite.

Metoda Cajal

Reactivi necesari :

1. soluție de azotat de Ag 3%
2. amestecul reducător :
   — protargol . . . . . 1 g
   — formol . . . . . 5 ml
   — apă distilată . . . . . 100 ml
3. soluție de clorură de aur 1%

Tehnica de lucru :

— fixarea 24—48 ore a fragmentelor de organe nervoase în alcool 96, la care se adaugă 1—10 picături de amoniac.

— spălarea pieselor în apă distilată, pînă cad pe fundul vasului ;

— tratare cu soluția 1 la temperatura de 37° timp de 5—6 zile (la întuneric)

— spălare rapidă cu apă distilată ;

— reducere (la întuneric) în soluția 2, 24—36 ore ;

— spălare în apă distilată ;

— deshidratare și clarificare rapidă ;

— incluzia în parafină ;

— secționarea la 10—15 microni ;

— deparafinarea și hidratarea secțiunilor ;

— tratarea secțiunilor cu soluția 3, 2′ ;

— fixare în soluția de tiosulfat de sodiu timp de 5′—10′ ;

— spălare în apă de robinet pînă la 2 ore ;

— deshidratare, clarificare ;

— montare în balsam de Canada.

Rezultatul colorației : fibrele nervoase și neurofibrilele apar impregnate în negru, celulele nervoase sînt cenușiu închis. Nu se colorează fibrele gliale.

Metoda Ranson (pentru fibrele nervoase)

Fixarea pieselor două zile în amestecul : alcool absolut 100 ml, amoniac 1 ml.

— spălare în apă distilată 3′ ;

— trecerea pieselor 24 ore în piridină ;

— impregnare 3 zile cu azotat de argint 2% la întuneric la temperatura de 35° ;

— spălare scurtă în apă distilată ;

— reducere timp de 1—2 zile în amestecul :
   pirogalol . . . . . 4 g
   apă distilată . . . . . 100 ml
   formol . . . . . 5 ml

— deshidratarea și clarificarea pieselor ;

— incluzia în parafină ;

— secționare la 10 microni ;

— deparafinare ;

— montarea în balsam de Canada.

Rezultat : fibrele apar impregnate în cafeniu închis.

Dintre *metodele histochimice* menționăm :

6.7. METODE DE EVIDENȚIERE A ACIZILOR NUCLEICI

Metoda Feulgen-Rossenbeck

Reactivi necesari :

1. Reactivul Schiff
2. Apă sulfuroasă
3. Acid clorhidric normal
4. Verde lumină 0,5%

Metode de preparare a reactivului Schiff :

a) — apă distilată fiartă . . . . . 200 ml
— fuxină bazică . . . . . 1 g

se agită amestecul 5′ fără încălzire. Se lasă să se răcească la temperatura de 50°, se filtrează în sticlă cu dop șlefuit și se adaugă 20 ml acid clorhidric. Se răcește la apă de robinet pînă la 25° și se adaugă 1 g de bisulfat de sodiu anhidru. Se ține la întuneric. (Trebuie să aibă culoarea galben-pai).

b) Metoda Coleman

— fuxină bazică . . . . . 1 g
— apă fiartă . . . . . 200 ml

Se răcește și se filtrează. Se adaugă metabisulfit de potasiu 2 g și 10 ml de acid clorhidric normal. Se lasă în repaus în flacon închis, 24 ore. Se adaugă cărbune activ 0,5 g, se filtrează și se păstrează la frigider.

c) Metoda Langley

— metabisulfit de sodiu sau potasiu . . 0,5 g
— acid clorhidric 0,15 N . . . . . 100 ml
— fuxină bazică . . . . . 5 g

Se agită. Nu se încălzește. În repaus 2—3 ore. Se adaugă 0,3 g cărbune activ, se agită două minute și se filtrează. Se păstrează la rece.

Metode de preparare a apei sulfuroase :

a) — bisulfit de sodiu lichid concentrat . . 10 ml
— acid clorhidric normal . . . . . 10 ml
— apă distilată . . . . . 200 ml
b) — apă distilată . . . . . 200 ml
— soluție bisulfit de sodiu 10% . . . 10 ml
— acid clorhidric normal . . . . . 10 ml

Tehnica de lucru în metoda Feulgen :

— deparafinarea, hidratarea secțiunilor și dacă este cazul, înlăturarea precipitatului de sublimat ;

— hidroliza 5—15 minute în acid clorhidric normal, la etuvă, la temperatura de 57°—58° ;

— spălare foarte rapidă în apă distilată ;

— colorare timp de 1, 1/2 oră în reactivul Schiff ;

— spălare directă în 3 băi de apă sulfuroasă ;

— spălare la apă de robinet timp de 10 minute ;

— colorare cu verde lumină (foarte scurt). Acest timp poate să lipsească ;

— deshidratare, clarificare ;

— montare în balsam de Canada.

Rezultatul colorației: nucleii celulelor sînt colorați în violet.

Metoda Brachet (evidențierea acizilor nucleici cu verde de metil pironină) (Fig. 202 b—1).

Reactivi necesari :

verde de metil pironină
— clorură de sodiu . . . . . 6,8 g
— acetat de sodiu . . . . . 3,9 g
— veronal sodic . . . . . 5,6 g
— pironină . . . . . 2,5 g
— verde de metil . . . . . 1,5 g
— apă distilată . . . . . 996,4 ml
— acid clorhidric concentrat . . . . . 3,6 ml

Tehnica de lucru :

— deparafinare, dacă este cazul coloidionarea secțiunilor, hidratare :
— colorare 20'—1 oră cu amestecul de verde de metil-pironină : pH 4,7 ;
— spălare rapidă în apă distilată ;
— trecere foarte rapidă prin alcool de 70, 90 ;
— deshidratare rapidă cu alcool absolut ;
— clarificare ;
— montare în balsam de Canada.

Rezultat : nucleul în verde, restul în nuanțe de roșu.

6.8. METODE PENTRU EVIDENȚIEREA GLICOGENULUI

Tehnica Mc. Manus (PAS)

Reactivi necesari :
1. Acid periodic 1%
2. Reactivul Schiff
3. Apă sulfuroasă
4. Hemalaun Mayer

Tehnica de lucru :

— deparafinare, hidratare și înlăturarea sublimatului dacă este cazul ;
— coloidionare 5'—10' ;
— apă distilată ;
— acid periodic 1% 4' ;
— spălare scurtă (două băi) cu apă distilată ;
— colorare cu reactivul Schiff 20' ;
— spălare în 3 băi de apă sulfuroasă 5' fiecare ;
— apă de robinet, cel puțin 30' ;
— apă distilată ;
— colorarea nucleilor cu hemalaun 15'—20' ;
— spălare în apă de robinet cel puțin o oră ;
— deshidratare și clarificare ;
— montare în balsam de Canada.

Rezultatul colorației : glicogenul colorat în roșu, ca și mucusul, fibrele de reticulină și conjunctive, substanța fundamentală a cartilajului (Fig. 202 a 3, 202 b 4, 5).

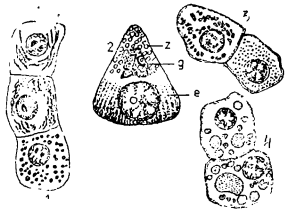


Fig. 202 a — 1 — condriom în celulă hepatică ; 2 — complex Golgi în celulă pancreatică exocrină ; 3 — glicogen în celule hepatice ; 4 — incluziuni lipidice în celule hepatice.

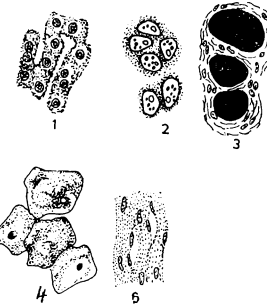


Fig. 202 b — 1 — acizi nucleici în celule hepatice ; 2 — grăsimi neutre în celulele cartilaginoase ; 3 — grăsimi neutre în celulele grase ; 4 — glicogen în celulele epiteliului vaginal ; 5 — glicogen în fibre musculare striate.

6.9. METODE PENTRU EVIDENȚIEREA LIPIDELOR

Fixare 12—24 ore în formol calcic sau formol cadmic (formol 10% și 3% azotat sau acetat de cadmiu). Formolul are acțiune de precipitare a proteinelor, iar cadmiul și calciul reacționează cu lipidele formînd săpunuri solide, insolubile.

Lipidele se pun în evidență cu coloranți numiți lisocromi, care reprezintă substanțe organice cu grupări cromofore. Cei mai folosiți coloranți sînt Sudan roșu și Sudan negru B.

— 2 g, clorură de Ca, completat pînă la 100 ml cu formol 10% ;
— colorarea cu Sudan roșu sau negru, în cristalizoare mici.

Reactivi necesari :

1. Soluția saturată din colorantul ales, în alcool 70
   — alcool 70 . . . . . 95 ml + 5 ml acetonă
   — colorant (Sudan roșu sau negru) . . . . 2 g

Se ține la etuvă la 37° timp de 12 ore, se răcește și apoi se filtrează.

Tehnica de lucru :

— secțiuni la gheață ;
— spălare rapidă în alcool 70 ;
— colorare cu Sudan negru (1—2 ore) sau cu Sudan roșu (6—12 ore)
— spălare rapidă în alcool 70 ;
— spălare în apă distilată ;
— colorarea nucleilor cu hemalaun sau carmin (în raport cu colorantul folosit) ;
— spălare în apă curgătoare ;

— montare în polivinilpirolidonă, în sirop Apaty cu glicerină gelatinată.

Rezultatul colorației : Lipidele apar colorate în negru cu Sudan negru și în roșu, cu Sudan roșu (Fig. 202 a 4 ; 202 b 2, 3).

6.10. METODĂ PENTRU COLORAREA FROTIULUI ÎN SÎNGE

Reactivi necesari :

1. Soluția May-Grümwald (eozinat de albastru de metilen dizolvat în alcool metilic) din comerț.

2. Soluția Giemsa (azur II dizolvat în alcool metilic și glicerină neutră) din comerț.

Tehnica de lucru :

— pe frotiul proaspăt, uscat la aer, se pun 20—30 picături de soluție May-Grümwald, 3′ ;

— se adaugă un număr egal de picături de apă distilată 10′—15′ ;

— se înlătură colorantul și fără spălare se toarnă soluția Giemsa diluată cu apă distilată (o picătură din soluția Giemsa la 1 ml de apă) timp de 15′—25′ ;

— spălare la curent de apă de robinet. Secțiunile trebuie să aibă o culoare violacee-roză. Dacă sînt prea albastre, se diferențiază mai mult la apa de robinet, sau se acoperă pentru cîteva secunde cu o soluție de acid boric 1%;

— deshidratare, clarificare ;

— montare, de preferință în ulei de cedru.

Rezultatul colorației : citoplasma, roză nucleii, albastru-violet, granulele acidofile — roșu intens, granulele bazofile — violet-închis, hematiile — cărămizii (Fig. 202 C).

Frotiul de sînge se obține în felul următor : se pune o picătură de sînge, aproape de extremitatea unei lame de sticlă curată. Cu ajutorul unei alte lame înclinată în unghi de 45° față de prima, se întinde picătura de sînge într-un strat uniform de gros. Frotiul se lasă să se fixeze prin uscare și apoi se colorează.

Pe lîngă tehnica secțiunilor la parafină se uzitează și tehnica secțiunii pieselor congelate care, deși nu oferă secțiuni fine și seriate este folosită pentru studiul enzimelor, lipidelor sau pentru impregnări.

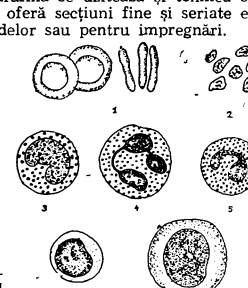


Fig. 202 c 1 — hematii 2 — plachete sanguine 3 — bazofil 4 — neutrofil 5 — acidofil 6 — limfocit 7 — monocit

7. STUDIUL CROMOZOMILOR LA ANIMALE

7.1. PREPARAREA CROMOZOMILOR DIN SÎNGELE PERIFERIC

Materiale necesare :

1. Ace de venisecție sterilizate, de dimensiuni adecvate speciei și vîrstei individului de la care se recoltează sîngele.

2. Seringi sterilizate și heparinizate în cazul donatorilor mici sau nou-născuți.

3. Eprubete sterilizate, heparinizate și prevăzute cu dop etanș.

4. Spirt medicinal și tampoane de vată.

5. Mediu de cultură (RPMI 1640 sau Eagle minimal sau McCOY'S) suplimentat cu : 15—20% ser fetal bovin, 1% soluție de antibiotice, 1—2% soluție de L-Glutamină și 1% Phytohemaglutinină-M. Suplimentarea mediului de cultură se face imediat înainte de inițierea culturii.

6. Flacoane de cultură sterilizate. Se pot folosi diferite tuburi pentru cultivarea limfocitelor : flacoane de antibiotice (de preferat de 20 ml), tuburi din plastic (NUNC sau Falcon) sau dacă este posibil, tuburi pentru cultivarea limfocitelor (vials).

7. Pipete gradate de diverse capacități.

8. Colchicină, soluție 0,2% sau Colcemid.

9. Soluție hipotonă de KCl 0,075 M.

10. Soluție fixatoare metanol-acetic 3 : 1 rece. De obicei, se prepară extemporaneu cu metanol păstrat la 4°C.

11. Lame pentru microscop, bine degresate și răcite de gheață.

12. Pipete Pasteur.

13. Pere de cauciuc de 10 cc.

14. Tuburi de centrifugă.

15. Colorant Giemsa (Gurr sau Merck).

Etapele de lucru

1. Heparinizarea seringilor : se efectuează cu cîteva ore sau imediat înainte de recoltarea sîngelui, prin aspirarea (în condiții aseptice) a circa 1 ml heparină și plimbarea pistonului pînă la capătul seringii în așa fel încît să se umecteze tot peretele interior al acesteia. Se elimină apoi tot surplusul de heparină în fiola originală. Dintr-o fiolă de 1 ml se pot hepariniza 5 seringi de 10 ml. Cantitatea minimă de heparină per ml de sînge este de 25 UI, iar cea maximă de 100 UI/ml.

2. Recoltarea probei de sînge : se va face în condiții cît mai apropiate de asepsie. Se șterge bine locul unde se face venisecția cu un tampon de vată îmbibat în spirt și se așteaptă să se usuce (nu se folosește alt dezinfectant care poate fi toxic pentru cultura de sînge). Se punctionează vena cu acul adecvat și se aspiră în seringă sau se colectează în eprubetă, cel puțin 2 ml sînge. Se notează pe seringă sau pe eprubetă numărul matricol sau numele animalului și se transportă cît mai repede posibil la locul unde se inițiază cultura.

3. Inițierea culturii : în fiecare tub de cultură se distribuie cîte 4,5 ml de mediu complet, cu ajutorul unei pipete gradate. Se adaugă apoi cîte 0,5 ml de sînge total la fiecare tub. Numărul de tuburi de cultură per caz se stabilește în funcție de metodele de colorare specială propuse a se aplica pentru investigarea cazului respectiv. Simpla testare a numărului de cromozomi, necesită numai 2 tuburi. Urmează omogenizarea prin întoarcerea tubului cu dopul în jos, apoi incubarea la o temperatură identică temperaturii corporale a speciei de la care s-a recoltat sîngele.

4. *Durata incubării :* 48—72 de ore, în funcție de specie.

5. *Prepararea frotiurilor citogenetice*

După terminarea perioadei de incubație se adaugă 0,3 ml de colchicină 0,02% la fiecare tub în parte, după care se mai incubează încă 2 ore. Se trece apoi conținutul tuburilor de cultură în cupe de centrifugă și se sedimentează celulele la 800—1000 rpm timp de 10 minute. Se înlătură supernatantul prin aspirare cu o pipetă Pasteur atașată la trompa de vid. Se resuspendă celulele în 10 ml soluție hipotonă de KCl 0.075 M preîncălzită la 37°C și se lasă la termostat 15—30 minute în funcție de specie. Se centrifughează 10 minute la 800—1000 rpm și se aspiră supernatantul care are culoare roșie datorită spargerii hematiilor în soluția hipotonă. Peste sedimentul de limfocite rămas, se adaugă picătură cu picătură, 5—6 ml soluție fixatoare (metanol acetic 3 : 1) preparat extemporaneu cu metanol rece. Se omogenizează suspensia celulară prin pipetare cu o pipetă Pasteur prevăzută cu pară de cauciuc. Se lasă apoi la frigider 20—30 minute după care se centrifughează la 1000 rpm. Se aspiră supernatantul și se adaugă 2 ml fixator. Se omogenizează cu o pipetă Pasteur (aceiași care s-a folosit anterior) și se execută un preparat de probă prin picurarea a 2—3 picături din suspensia celulară pe lama curată și răcită. Se lasă să se usuce la aer, se colorează 5 minute într-o soluție Giemsa 5% și se vizualizează la microscopul optic gradul de dispersie al cromozomilor în plăcile metafazice precum și numărul diviziunilor (dacă sînt suficiente celule în diviziune pentru a putea face un studiu complet). Dacă se apreciază că proba este reușită, se repetă operațiunile de fixare-centrifugare de 3—4 ori consecutiv după care se efectuează cel puțin 10 preparate pentru fiecare caz.

Colorarea preparatelor pentru stabilirea stării genomului se face în etape : mai întîi se colorează clasic 1—2 preparate, după care, se aplică diverse tratamente de colorare specială la frotiurile rămase, dacă este cazul elucidării unor eventuale stări anormale.

7.2. PREPARAREA CROMOZOMILOR DIN CULTURI LIMFOCITARE

În cazul în care se dorește cultură numai de limfocite, se procedează la izolarea acestora prin centrifugare pe gradient de Ficoll-paque.

Materiale necesare

1. Ficoll-paque = soluție sterilă care se păstrează la temperaturi cuprinse între 4°C și 25°C, la loc ferit de lumină.
2. Sînge recoltat în condiții aseptice pe anticoagulant.
3. Soluție salină sterilizată (cel puțin 20 ml pentru fiecare probă). Se folosesc două soluții stoc : A și B.

Stoc A :

— D-Glucoză anhidră	0,1% (1g)
— $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	5×10^{-5} M (0,0074 g)
— $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	$9{,}8 \times 10^{-4}$ M(0,1992 g)
— KCl	$5{,}4 \times 10^{-3}$ M (0,4026 g)
— TRIS	0,145 M (17,565 g)

Se dizolvă în aproximativ 950 ml de apă distilată și se ajustează pH-ul cu HCl 1 N pînă la 7,6, apoi se completează volumul de 100 ml cu apă distilată.

Stoc B :

— NaCl	0,14 M (8,19 g)

Sterilizare prin autoclavare.

Soluția salină de lucru : 1x. Se amestecă un volum din stocul A cu 9 volume din stocul B. Se prepară o dată pe săptămînă.

Conservare : stocurile la 4°C, iar soluția de lucru, la temperatura camerei.

4. Tuburi de sticlă de 10 ml, sterilizate (cîte două bucăți de probă).
5. Pipete Pasteur de 3 ml (două bucăți/probă).
6. Tuburi de centrifugă din sticlă, sterilizate la care se pot ataşa dopuri de cauciuc în timpul centrifugării.

Procedura

1. Pentru scoaterea cantității dorite de Ficoll-paque, se folosește o seringă sterilă prevăzută cu ac. Se înfige acul prin dopul de cauciuc, se injectează aer din seringă pentru a egala presiunea, se inversează sticla cu dopul în jos și se aspiră cantitatea dorită.
2. Se adaugă cîte 3 ml de Ficoll la fiecare tub de centrifugă.
3. Se diluiază sîngele cu soluția salină în raport de 1/1. De obicei se folosesc 2 ml sînge și 2 ml de soluție salină pentru un volum minim de 4 ml. Sîngele diluat, se așează cu grijă peste ficolul din tubul de centrifugă (cei 4 ml de sînge diluat), fără a se amesteca cele două faze).
4. Se centrifughează la 800—1000 rpm timp de 30 minute la temperatura camerei.
5. Se extrage cu ajutorul unei pipete Pasteur stratul superior, lăsînd nederanjată banda de limfocite de la interfață. Stratul superior de plasmă poate fi folosit ulterior în alte scopuri, așa că este bine să se păstreze.

Spălarea limfocitelor

1. Folosind o pipetă Pasteur sterilă, se transferă banda de limfocite într-un tub de centrifugă steril.

2. Se adaugă cel puțin trei volume de soluție salină peste limfocite și se omogenizează cu ajutorul unei pipete Pasteur.

3. Se centrifughează la 800—1000 rpm timp de 10 minute.

4. Se înlătură supernatantul și se resuspendă limfocitele în 6 ml de soluție salină cu ajutorul unei pipete Pasteur.

5. Se centrifughează din nou și se repetă spălarea în soluție salină de încă 2—3 ori.

Limfocitele astfel izolate și spălate pot fi folosite pentru cultivare pe termen scurt sau ca celule parentale în lucrări de hibridizare celulară somatică „in vitro".

În cultură, densitatea limfocitelor per ml de mediu nu trebuie să fie mai mare de un milion, nici sub 200.000 pentru a asigura dezvoltarea corespunzătoare a acestora. Mediul folosit, timpul de incubare și efectuarea preparatelor este identic cu cel descris la cultura din sînge total.

7.3. PREPARAREA CROMOZOMILOR DIN SUSPENSII CELULARE

Material:

În principiu, toate suspensiile care conțin mitoze: culturile de sînge, măduva osoasă, supensiile obținute după tripsinizarea celulelor fibroblastice sau epiteliale, aspiratele ascitice sau pulmonare.

Etapele:

1. Se trece suspensia într-un tub de centrifugă (conic de preferință) de 15 ml și se centrifughează 8 minute la o turație de pînă în 1300 rpm.

2. Se înlătură cu grijă supernatantul și se resuspendă sedimentul celular în ultima picătură rămasă din supernatant, prin scuturare. Nu se folosește pipetă.

3. Se adaugă cca 8 ml soluție hipotonă (0,075 M) de KCl preîncălzită la 37°C și se incubează la aceiași temperatură timp de 15—30 de minute.

4. Se centrifughează ca la punctul 1.

5. Se înlătură supernatantul și se procedează ca la punctul 2.

6. Se adaugă fixator proaspăt preparat (o parte acid acetic glacial și trei părți metanol rece).

7. Se centrifughează ca la punctul 1.

8. Se repetă operațiunile de la punctul 2.

9. Se repetă etapele 6—8 cel puțin o dată.

10. Se adaugă fixator proaspăt la sedimentul celular (cca de 5 ori volumul sedimentului celular) și se resuspendă celulele folosind o pipetă fină, așa încît să se obțină o suspensie lăptoasă.

11. Se transferă o picătură de suspensie pe o lamă curată, umectată cu apă distilată și se suflă peste suprafața lamei pentru a distribui omogen suspensia celulară.

12. Se colorează 2 minute într-o soluție 5% Giemsa și se verifică la microscop. Dacă densitatea celulară este prea mare, se mai adaugă fixator ; dacă cromozomii sînt prea îngrămădiți în placa metafazică, se repetă etapele 6—8.

13. Se efectuează atîtea preparate cîte se apreciază a fi necesare în funcție de importanța probei și de metodele de bandare ce urmează a fi aplicate.

7.3.1. COLORAREA CLASICĂ, ORTODOXĂ SAU CONVENȚIONALĂ

Materiale necesare :

1. Preparate de calitate bună.

2. Soluție Giemsa a cărei concentrație se stabilește în funcție de calitatea ei, putînd fi 2% (Giemsa Gurr sau Merck) și 5% sau chiar 10% în alte cazuri.

3. Laverane sau pahare Borell.

Înainte de folosire, soluția Giemsa se filtrează.

Procedura : în laveranul bine spălat se așează lamele cîte una în fiecare spațiu și apoi se adaugă colorantul pînă se acoperă preparatele. Dacă nu avem laveran, folosim un pahar în care așezăm lamele una în spatele celeilalte pentru a un se zgîria fața cu celule. Se lasă 2 pînă la 30 de minute după care se scot cu ajutorul unei pense. Se spală cu apă de robinet, se usucă și se montează în Eukitt. Aceiași baie de colorare este utilizabilă în decursul unei zile pentru un număr nelimitat de preparate.

Alți coloranți folosiți cu succes : aceto-orceina, fuchsina, carmin, Leischmann, pinacyanol.

7.3.2. ANALIZA MICROSCOPICĂ A PREPARATELOR CITOGENETICE

Analiza se face direct la microscopul optic cu obiectivul 100 cu imersie, după ce localizarea metafazelor a fost făcută cu obiectivul mic (de 16 sau 20). De obicei, se efectuează desene în special pentru speciile care au un complement cromozomial diversificat morfologic. Desenele, asigură corectitudinea numărării și verificării integrității structurale a fiecărui cromozom în parte. Importanța observațiilor microscopice directe nu trebuie să fie supraestimată. Se recomandă să se facă cel puțin un desen pentru fiecare probă investigată, deoarece multe modificări „mici", nu sînt vizibile pe fotografii.

Numărul metafazelor ce se cer a fi examinate poate varia între cîteva și pînă la peste 100.

Pentru testare de rutină, se recomandă analiza a 10—15 metafaze de calitate bună, în cazul reproducătorilor (vieri, tauri etc.). În cazul liniilor celulare, se analizează 50—100 de celule metafazice. În cazul în care la testarea de rutină se identifică indivizi cu anomalii genomice, numărul metafazelor investigate trebuie să fie suficient de mare (50—100) pentru o prelucrare a datelor.

Evaluarea datelor citogenetice. Atît analiza cît și evaluarea datelor citogenetice, trebuie să ia în considerare diferențele dintre laboratoare și dintre observatori.

Nu există mod de abordare categoric, însă, se cer a fi respectate unele reguli ca : modul de obținere a rezultatelor, gradul de extindere a investigațiilor, siguranța și reproductibilitatea lor, pentru așa-zisul „limbaj comun" de înțelegere și comparare, atunci cînd se ajunge la expunerea publică a unei lucrări de acest profil.

7.3.3. MICROFOTOGRAFIEREA

Este recomandabil ca pentru obținerea unor microfotografii de calitate, să se folosească un fotomicroscop Zeiss cu expunere automată, care asigură uniformitatea contrastului atît de important în realizarea investigațiilor citogenetice. Filmul cel mai des utilzat este un Dokument de 5 Dyne sau Azomureș de 5—9 Dyne.

Oricare ar fi filmul sau aparatul la care se execută microfotografiile, se recomandă mai întîi tatonarea timpului de expunere. În cazul folosirii fotomicroscopului Zeiss și a filmului DK5, expunerea se face automat, deschizînd diafragma la 15 și folosind filtrul verde. După developarea filmului, se fac fotocopii folosind hîrtie CB11 Azomures. Aceste fotografii sînt folosite pentru întocmirea cariotipului : fiecare cromozom în parte este decupat și ordonat conform indicațiilor comisiilor de standardizare pentru fiecare specie în felul ei. Deci, după identificarea perechilor de omologi și ordonarea caracteristică, se lipesc, se numerotează și se consideră cariotipul gata întocmit. Acesta este cariotipul de lucru care se raportează pe film DK5 sau Azocopy.

7.4. METODE DE BANDARE

Deoarece multe animale prezintă cromozomi asemănători ca dimensiune și morfologie, acum se practică „bandarea" cromozomilor pentru analiza cariotipului. Diferitele metode de bandare ușurează detectarea rearanjamentelor cromozomale precum și identificarea corectă a fiecărui cromozom. Tipurile de handări folosite astăzi sînt : G-, R-, Q-, C- și T-. Deseori este nevoie să se folosească mai multe tehnici de bandare pentru a obține informația necesară pentru analiza cromozomală.

Bandarea Q- nu implică pretratarea cromozomilor și este poate cea mai puțin sensibilă dintre tehnicile de bandare. Ea necesită folosirea unui microscop cu fluorescență și nu permite preparate permanente. Bandarea G- depășește aceste dificultăți și permite o rezoluție mult mai mare a acelorași modele de benzi. Totuși, bandarea G-, presupune folosirea preparatelor cu cromozomi de cea mai bună calitate și produce o scurtare vizibilă a lungimii acestora. Bandarea R- este reversul bandărilor G- și Q-, colorînd astfel și terminațiile cromozomilor care sînt necolorate prin bandare Q- și G-. Este esențială folosirea în paralel a bandării R și G pentru identificarea delețiilor terminale și translocațiilor la toți cromozomii. Cea mai populară metodă de bandare R- folosește incorporarea bromodeoxiuridinei (BUdR) în mediul de cultură înainte de recoltarea celulelor pentru preparate cromozomale. Avantajul acestei tehnici este că nu necesită tratament cu căldură sau soluții saline a cromozomilor, care cauzează despiralizarea lor morfologică. Bandarea T- se folsește pentru identificarea cromozomilor care nu diferă

mult în dimensiune și morfologie. Bandarea C- este esențială în identificarea fuziunilor dicentrice și a cromozomilor de sex.

Au fost găsite multe substanțe care pot produce benzi pe cromozomi. În general, digestia enzimatică dă numai bandare G- iar tratarea prelungită distruge morfologia. Procedurile care implică denaturare termică, pe de altă parte, au fost folosite și se folosesc pentru a produce benzi G-, R-, C- și T- depinzînd de timpul și temperatura tratamentului termic și de concentrația în ioni și pH-ul mediului de incubare. Este esențial ca, pentru fiecare tip de bandare să se mențină cu grije condițiile o dată stabilite, întrucît cea mai mică modificare poate altera calitatea benzilor.

7.4.1. BANDAREA „Q"

Pentru bandarea Q-, ca și pentru toate metodele de bandare, preparatele cromozomale trebuie să fie de cea mai bună calitate. Nu trebuie să existe citoplasmă în jurul cromozomilor care nu vor fi prea contractați, bine dispersați.

Quinacrina. Diferența de bază dintre tehnica originală descrisă de Caspersson (Caspersson și col., 1971, 1970) și cea a altor autori (Niikawa și Kajii, 1975 ; Lin și col., 1975) constă în înlocuirea quinacrinei dihydroclorid cu quinacrină mustard, timpul de colorare și tampoanele alese. Mai folosită este quinacrina dihydroclorid. Timpii de colorare folosiți sînt cuprinși între 6—20 de minute, iar pH 4,5 și 5,5 au dat cea mai strălucitoare fluorescență și cele mai distinctive benzi. Apa bidistilată, la acest pH, este superioară tamponului.

Înainte de colorare, preparatele sînt rehidratate prin trecere prin etanol de 90%, 70% și 50% + apă distilată. După uscare, lamele sînt imersionate pentru 10 minute în 0,5% quinacrine dihydroclorid (poate fi folosit 0,005% quinacrine mustard) preparată în apă bidistilată pH 4,5. Lamele sînt apoi spălate în apă bidistilată (cu jet) timp de 3 minute. Spălarea prelungită poate reduce din intensitatea fluorescenței, în timp ce spălarea insuficientă, benzi mai puțin clare. Montarea se face în aceiași apă lipind lamela cu lac de unghii incolor sau Krönig cement. Examinarea lamelor se face la un microscop Zeiss prevăzut cu iluminare verticală și o lampă cu mercur HBO 200 ca sursă de lumină și un set de iluminare Ploem 3. Filtru de excitație este BG 38, iar filtrul barieră K 510.

Höechst 33258 : Lamele sînt plasate într-o soluție proaspăt preparată de Höechst 33258 pentru 10 minute. Apoi sînt spălate în montate în apă distilată. Examinarea se face la microscop cu fluorescență. Se folosesc filtre de excitație BG 38 și BG 12, iar filtre barieră 53 44.

Cu această metodă, se pot obține la unele specii benzi C, în timp ce la alte specii, bandare Q sau amestec de C și Q (Halwig și Gropp, 1972 ; Jalat și col., 1975). Spre deosebire de quinacrină, există o relație aproape liniară între fluorescența obținută cu Höechst și conținutul în A—T al DNA-ului.

Antibioticele. Cîteva antibiotice cunoscute ca anthracycline, sînt capabile să producă benzi fluorescente identice cu benzile Q (Lin și van de Sande, 1975). Lamele sînt imersionate într-o soluție 0,5 mg/ml

de daunomycin sau 0,2 mg/ml de adrymycin în tampon fosfat 0,1 M pH 4,3. După spălare de încă trei ori în același tampon, lamele sînt montate și examinate folosind filtru de excitație KP 500 și un filtru barieră 50. Benzile astfel produse sînt mult mai stabile însă mai puțin intense.

7.4.2. BANDAREA „G"

Bandarea G este produsă prin colorare cu Giemsa după tratarea cromozomilor cu oricare dintr-un număr de tehnici care alterează structura proteinelor. Este cea mai populară metodă de bandare pentru că: 1) dă același model de benzi cu quinacrina însă cu o rezoluție mai mare, 2) permite preparate permanente și 3) nu necesită microscopie fluorescentă.

Denaturarea termică. Metoda originală Acid-Saline-Giemsa (ASG) pusă la punct de Sumner și col. 1971), implică incubarea în 2 x SSC pentru o oră la 60°C. Preparatele erau apoi trecute într-o soluție Giemsa în tampon Sörensen, pH 6,8, pentru o oră și jumătate.

Drets și Shaw (1971) au modificat această tehnică prin includerea unui tratament inițial cu hidroxid de sodiu 15—20 secunde. După spălare insistentă cu 2 x SSC, pH 7,0, timp de 5—10 minute, preparatele sînt incubate pentru 18—24 de ore în 2 x SSC, pH 7,0 la 65°C. După trecerea prin băi de etanol de concentrații crescătoare, lamele se colorează cu Giemsa.

Digestia enzimatică. Seabright (1971) a introdus o metodă extrem de rapidă de bandare G, folosind tripsina. Lamele se inundă în tripsină 0,25% preparată în soluție salină izotonă pentru 10—15 secunde la 37°C. Se spală apoi cu soluție salină și se colorează 3—5 minute cu Leishman diluat 1 : 4 în tampon Sörensen la pH 6,8.

La această metodă s-au adus numeroase modificări care permit un control mai fin al bandării. Majoritatea cercetărilor folosesc soluție de tripsină 0,25% preparată în Hanks' care nu are ioni de Mg și Ca și preferă o temperatură mai mică de 37°C pentru digestie. Colorarea cu Giemsa este folosită mult mai frecvent decît cea cu Leishman.

Substanțe care denaturează proteinele. Bandare G a fost produsă și cu dodecil sulfat de sodiu, 7X, și cu uree (Shiraishi și Yoshida, 1972; Lee și col., 1973; de Grouchy și Chavin-Colin, 1973) Cea mai populară se pare că este metoda lui Shiraishi și Yoshida. Preparatele sînt tratate cu o soluție din 3 părți uree 8M și o parte tampon Sörensen pH 6,8 la 37°C. După spălare foarte bine cu apă de robinet, lamele sînt colorate cu Giemsa la pH 6,8.

7.4.3. BANDAREA „R"

Bandarea R este reversul bandării G și poate fi realizată printr-o varietate de metode.

Denaturare termică. Cea prezentată, este o modificare a tehnicii originale a lui Dutrillaux și Lejeune (1971). Lamele sînt incubate în soluție salină Earle' (pH 5,1) în baie termostat la 87°C. În funcție de vechimea preparatelor, tratamentul durează 10—30 minute. Lamele sînt apoi spălate și colorate în Giemsa la pH 6,8.

Bobrow și Madan (1973), după incubarea preparatelor în tampon Sörensen (pH 6,5) la 85°C, au folosit acridine orange 0,01% pentru colorare. Deși această colorare necesită folosirea microscopului cu fluorescență, rezultatele sînt mult mai constante.

Tratamentul cu BUdR. Zakharov și col. (1971) au introdus în mediul de cultură, BDUR într-o concentrație de 200 Mg/ml timp de 7 ore înainte de sacrificarea culturii. Acest tratament împiedică condensarea unor zone ale cromatidelor, iar cînd sînt coloraţi cromozomii cu Giemsa, se vor distinge benzi R pe anumiţi cromozomi. Din păcate, mulţi cromozomi sînt bandaţi slab sau deloc.

Dutrillaux și col. (1973) au modificat procedura BUdR prin colorare cu acridine orange. Lamele sînt rehidratete în etanol de 90%, 70% și 50% apoi în apă distilată. După uscare sînt trecute nîtr-o baie de acridin-orange 0.005% în tampon Sörensen pH 6,8 pentru 20 de minute. Urmează spălare și montare în tampon. Dacă se spală insuficient, celulele apar prea oranj, iar dacă se spală prea mult, prea verzi. Cromozomii fluorescentează verde strălucitor în regiunile quinacrine negative cu o fluorescență inițial orange instabilă. După ce au fost iluminate pentru scurt timp, fluorescența verde devine mai discretă. Această metodă care implică tratamentul cu BUdR și acridine orange, pare să fie cea mai populară și mai de nădejde bandare R.

Tratamentul cu formaldehidă. Preparatele sînt incubate cu RN-ază (50 Mg/ml) pentru o jumătate de oră la 37°C (soluția stok de RN-ază trebuie să fie încălzită într-o baie de apă fiartă timp de 5—10 minute pentru înlăturarea DNazei contaminante). Lamele sînt trecute apoi prin alcool de 90%, 80%, 79% și apă distilată. Sînt apoi expuse la 0,07 N NaOH care conține 10% formalină (pentru a preveni renaturarea) timp de 2 –2 minute și jumătate și imersionate pentru 5 minute în 0,014% acridine orange (0,1% stoc apos diluat 1 : 7 cu tampon Maclicainels pH 6,0). Lamele sînt apoi spălate și montate în acelaşi tampon și examinate. Vechimea lamelor se pare că are importanță : să fie de 2—3 săptămîni, iar cel mai vechi sînt de nebandat.

Antibioticele. Olivomycina (van de Sande și col., 1977) și actinomycina D în combinație cu DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) (Schweiger, 1976) produc benzi R pe cromozomi. Producerea acestor benzi cu aceste antibiotice care se leagă specific la bazele G-C, sprijină teoria că secvența nucleotidică de-a-lungul cromozomului constituie determinantul primar în producerea de benzi fluorescente. Lamele sînt imersionate în soluție de antibiotice (olivomycin, 1 mg ml, pentru 20 de minute ; sau actinomycin D 0,25 mg/ml, pentru 20 de minute și apoi DAPI, 0,4 Mg/ml, pentru 5 minute) la pH 6,8 fără pretratament de vreun fel. Principalul dezavantaj al acestei proceduri este pălirea rapidă a fluorescenței care necesită un film extrem de rapid pentru fotografii.

7.4.4. BANDAREA C

Bandarea C localizează regiunile heterocromatice ale cromozomilor.

Denaturarea termică. Metoda originală a lui Arrighi și Hsu (1971) implică tratarea preparatelor pentru 30 de minute cu 0,2 N HCl, înainte de expunerea lor la RN-ază (100 Mg/ml în 2 x SSC) pentru 60 de minute

la 37°C. După spălarea insistentă în SSC, etanol de 70% și apoi 90%, lamele sînt tratate cu 0,07 N NaOH timp de 2 minute spălate și incubate în 2 x SSC la 65°C peste noapte. Preparatele se spală din nou în SSC, etanol 70% și 90% înainte de a fi trecute în soluție Giemsa tamponată la pH 6,8.

Ulterior, Craig-Holmes și col. (1973) au constatat că tratamentul cu RN-ază poate fi omis din tehnică.

McKenzie și Lubs (1973) au modificat procedura suplimentar prin omiterea tratamentului cu NaOH. Au mai stabilit că pH-ul soluției SSC este un factor foarte important în bandarea C. Dacă soluția SSC devine alcalină în timpul incubării, ea trebuie să fie schimbată cu 2 x SSC cald, pH 7,0 pentru ultimele 4—6 ore de incubație și numai o lamă trebuie incubată la fiecare 50 ml de soluție. Cu metoda lor, lamele sînt tratate în HCl 0,2 N timp de 15 minute, spălate cu apă distilată și incubate în 2 x SSC, pH 7,0 timp de 18—20 de ore. Lamele sînt apoi spălate în mai multe schimburi de etanol 70% și 90% și apoi colorate în Giemsa, pH 6.8.

Tratamentul cu $Ba(OH)_2$. În 1972, Sumner a introdus o metodă mai rapidă de bandare C, folosind $Ba(OH)_2$. Preparatele sînt tratate cu 0,2 N HCl timp pde o oră, spălate și incubate în soluție de 5% $Ba(OH)_2$ la 50°C, pentru 5—15 minute. După spălare insistentă în apă distilată, lamele sînt incubate în 2 x SSC pentru o oră la 60°C. Sînt spălate din nou cu apă distilată și colorate cu Giemsa tamponată.

7.4.5. BANDAREA „T"

În această metodă sînt colorate regiunile telomerice ale cromozomilor. Dutrillaux (1973) a folosit o soluție încălzită de apă distilată (94 ml) la care a adăugat 3 ml de tampon fosfat (pH 6,7) la 87°C. A adăugat 3 ml de Giemsa la acest amestec, înainte de a trata lamele pentru 5—30 minute. Celulele pot fi recoltate cu acridine orange pe aceleași lame (5 ml acridine orange în 100 ml tampon fosfat, pH 6,7). Înainte de colorare cu acridine orange, se decolorează lamele în etanol, și se spală cu apă distilată.

Cea de a doua tehnică a lui Dutrillaux (1973) implică un tratament de 20—60 minute la pH 5,1 fie în tampon fosfat, fie în soluție Earle la 87°C. Celulele sînt apoi colorate cu soluție Giemsa sau acridine orange.

7.4.6. TEHNICI DE BANDARE AMESTECATE

7.4.5.1. Bandarea CT

Schers (1974, 1976) a pus la punct o metodă care colorează heterocromatina centromerică precum și regiunile telomerice ale cromozomilor. Benzi slabe R se pot vedea la unii cromozomi colorați cu această tehnică.

Preparatele sînt tratate pentru 40 de minute într-o soluție saturată de $Ba(OH)_2$ la 60°C, spălate în apă distilată și apoi incubate în 2 x SSC timp de o oră la 60°C. După spălare, lamele sînt trecute fie într-o soluție Giemsa „11", fie Giemsa simplu. Soluția Geimsa „11" colorează mai puternic telomerele.

Chalma și Ruffie (1976) au modificat această tehnică și au obținut bandare C- și T- completă prin incubarea lamelor în soluție Hanks' la 91°C pentru 30 de minute. Lamele sînt apoi răcite în apă de robinet și colorate în soluție Giemsa.

7.4.6. DETALII PRIVIND FOLOSIREA METODELOR DE BANDARE

7.4.6.1. Metode de bandare „Q"

Evidențiază model de benzi „Q" caracteristic fiecărei specii identic cu modelul de benzi „G" numai că se folosește colorant fluorescent. Denumirea metodei provine de la inițiala fluorescromului quinacrine cu care se colorează preparatele în scopul bandării.

Toți derivanții quinacrine acționează pentru colorare prin intercalarea nucleului acridine în molecula de DNA și prin legarea ionică de partea lanțului cu grupări fosfat ale DNA-ului.

Fluorescența quinacrinei este amplificată de grupările AT din catena DNA și scade în regiunile **bogate în grupări GC.**

a) *Soluții necesare :*

1. Soluția de quinacrine : 500 mg quinacrine dihidroclorid la 100 ml de apă distilată. Se filtrează și se păstrează la frigider în sticlă brună.
2. Soluția de tampon fosfat citrat 0,02 M pH 7,0 :
Stoc A : Na_2HPO_4 . . . . 3,56 g/900 ml apă distilată
Stoc B : acid citric . . . . 1 g/100 ml apă distilată
Se amestecă stocul A cu B și se corectează pH-ul la 7.

b) *Colorarea :*

Preparatele se lasă la învechit cel puțin o zi, însă nu trebuie să fie mai vechi de **trei săptămîni.**

— Se introduce prepartul în soluția de quinacrine pentru 5—6 minute și se clătește apoi cu apă distilată.

— Peste preparatul orizontal se așează cîteva picături de tampon fosfat-citrat, peste care se aplică o lamelă. Cu o hîrtie de filtru se apasă lamela pentru a îndepărta surplusul de tampon.

— Se fixează lamela cu lac incolor de unghii de jur împrejur, în așa fel încît să se împiedice evaporarea tamponului în timpul analizei microscopice.

— Benzile cromozomale (cele pozitive) fluorescentează verde, iar regiunile interbenzi (benzile negative), roșu-portocaliu.

— Analiza microscopică se face în lumina fluorescentă (lampă HBO 200) cu filtru de excitație BG12 de 3 mm și filtru barieră OG-515 + GG9.

7.4.6.2. Bandarea „Q" prin denaturare termică

a) *Soluții necesare :*

— Soluție de NaOH 0,07 N
— Soluție tampon — fosfat KH_2PO_4/Na_2HPO_4 15 M, pH 6,8
— Soluție Giemsa : 1 parte Giemsa la 9 părți tampon fosfat.
— Etanol absolut și etanol de 70%

b) *Colorarea :* se introduce preparatul în soluția de NaOH 0,07 N timp de 90 de secunde la temperatura camerei (20°C). Se spală imediat

cu etanol de 70% și absolut, de 2—3 ori și se usucă. Se incubează preparatul în tampon fosfat pH 6,8 la 59°C timp de 15 ore, putîndu-se prelungi pînă la 24 de ore(se tatonează) într-o baie termostatată. Se spală cu apă deionizată, se colorează cu Giemsa 20 de minute, se usucă și se montează în Eukit.

a) *Soluții necesare :*

— Soluție de NaOH 0,07 N în NaCl 0,112 M, pH 12. (2,8 g NaOH + 6,2 NaCl/1.000 ml apă bidistilată)

— Soluție 12 x SSC pH 7,0 (105,2 NaCl + 52,9 g citrat trisodic/1.000 ml apă bidistilată. Se ajustează pH-ul la 7,0 cu HCl 0,1 N).

— Soluție Giemsa : 5 ml Giemsa, 3 ml metanol, 3 ml acid citric, 0,1 M și apă distilată pînă la 1.000 ml. Se ajustează pH-ul la 6,6 cu Na_2HPO_4 0,2 M.

b) *Colorarea :*

— Tratarea prepartului cu NaOH 0,007 N timp de 30 de secunde la temperatura camerei.

— Spălare de trei ori a cîte 10 minute în 12 x SSC pH 0,7.

— Incubarea prepartului în 12 x SSC la 65°C într-o baie termostatată, timp de 60—72 de ore.

— Spălarea preparatului în trei schimburi cu etanol 70% și etanol absolut cîte 3 minute fiecare.

— Uscare și colorare cu Giesma tamponată pH 6,5 timp de 5 minute.

— Spălare cu apă distilată, uscare și montare în Eukit.

7.4.6.3. Bandarea „Q" prin metoda ASG

a) *Soluții necesare :*

— Soluție 12 x SSC

— Soluție Giemsa : 50 ml tampon fosfat pH 6,8 + 1 ml Giemsa Gurr R 66.

b) *Colorarea :*

— Incubarea prepartului în 12 x SSC timp de o oră într-o baie de apă, termostatată la 60°C.

— Spălare cu apă deionizată.

— Colorare în soluție Giemsa timp de o oră—o oră și jumătate și spălare cu apă deionizată.

7.4.6.4. Bandarea G cu tripsină

Realizează evidențierea aceluiași model de benzi transversale de-a-lungul cromozomilor, ca și celelalte metode descrise anterior. Rezultatele sînt identice, repetabile și caracteristice fiecărei specii în parte Din experiența noastră, este preferabilă celorlalte metode de bandare G, evidențiind modele de benzi mult mai clare și mai tranșante. În caracterizările cariotipurilor animalelor la care prezentăm modele și nomenclatură pentru benzile G, am folosit această metodă.

a) Soluții necesare :

1. *Soluția de tripsină :* se adaugă în următoarea succesiune ; 2,5 g tripsină Difco 1 : 250 sau 1 : 288, 100 ml GKN cu roșu fenol lox (stock), 900 ml apă tridistilată și NaOH pînă ce pH-ul ajunge 7,4—7,5. Se distribuie în flacoane de cîte 100 ml și se conservă prin congelare.
2. *Soluția de GKN cu roșu fenol lox (stock).* Într-un balon cotat de 1.000 ml se adaugă : 80 g NaCl, 4 k KCl, 10 g D-glucoză, sau dextroză, 0,2 g roșu fenol, 3,5 g $NaHCO_3$ și apă bidistilată pînă la 1000. Se conservă la congelator.
3. *Soluția de versen :* într-un balon cotat de 1.000 ml se adaugă : 8,0 g NaCl, 0,2 KH_2PO_4, 1,55 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 0,3 g KCl, 0,2 g EDTA și apă bidistilată pînă la 1.000 ml. Se conservă la 4°C.
4. *Tampon fosfat 0,01 M, pH 7,0*
   Stoc A : 0,1 M Na_2HPO_4 : $2H_2$, pH 9,0 (17,8 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ + apă bidistilată pînă la 1.000 ml)
   Stoc B :. 0,1 M NaH_2PO_4, pH 5,5 (13,8 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ + apă bidistilată pînă la 1.000 ml)

b) *Băile de colorare și tratare a preparatelor*
Se pregătesc trei băi în care sînt trecute pe rînd preparatele :

1. Într-un pahar Borell se adaugă : tripsină 6 ml, GKN 24 ml, versen 30 ml
2. Baia de GKN dilut de lox
3. Baia de colorare : stoc A 5 ml, stoc B 5 ml, Giemsa 2 ml, apă bidistilată 90 ml.

c) *Procedura :* se introduce preparatul în baia nr. 1 timp de 15 secunde pînă la 3 minute în funcție de vechimea acestuia (cu cît este mai proaspăt cu atît timpul de tratare este mai scurt), apoi se imersionează în baia nr. 2 o secundă și se colorează în baia nr. 3, timp de 5—10 minute. Se clătește în soluție tampon fosfat, se usucă și se montează în Eukit.

Cele mai bune rezultate se obțin dacă se folosesc preparate de 7—8 zile după efectuare.

7.4.7. METODE DE BANDARE „R"

Evidențierea unui model de benzi invers decît cel obținut prin metodele descrise anterior, adică în loc de benzi pozitive sau întunecate se obțin benzi negative și invers, se face cu ajutorul metodelor „R" sau de reversie.

7.4.7.1. Bandarea R prin colorare cu Giemsa

a) *Soluții necesare :*

— Soluție tampon fosfat, pH 6,5
— Soluție Giemsa (4 părți tampon fosfat, 4 părți Giemsa și 92 părți apă bidistilată)

b) *Colorarea :*

— Se incubează prepartul în tampon fosfat pH 6,5 timp de 10—12 minute la 87°C.

— Se spală cîteva minute cu apă de robinet.
— Se colorează 10 minute cu soluția Giemsa și se spală cu apă distilată.

7.4.7.2. Bandarea R prin colorare cu acridine-orange

a) *Soluții necesare :*

1. Soluție de Acridine-orange : 100 mg acridin-orange + 7 ml Na_2HPO_4 + apă bidistilată pînă la 100 ml.
2. Soluție 2 x SSC (65 ml) + 35 ml formaldehidă.

b) *Colorarea :*

— Soluția de 2xSSC se preîncălzește la 65°C într-o baie de apă termostată, apoi se introduce preparatul în această soluție și se incubează timp de două ore (la 65°C).
— Cu 3 minute înainte de terminarea incubării, se introduce în soluția de tratare, 0,75 ml formaldehidă.
— Se scoate preparatul din baia de tratare și se clătește cu apă distilată apoi se introduce în etanol absolut 2 minute și se spală în cîteva băi de apă distilată.
— Se introduce în soluție de Acridine-orange 0,1% timp de 10 minute pH 6,8—7,0.
— Se clătește prin pipetare cu apă tamponată (pH 6,8—7,0) și se montează o lamelă peste tampon fosfat, cu cement Krönig (sau lac incolor de unghii), lipind marginile lamelei de cele ale lamei în scopul protejării evaporării tamponului cît se analizează preparatul.
— Analiza se face la microscop prevăzut cu o lampă de mercur HBO 200, care iradiază preparatul colorat fluorescent. Acridin-orange dă fluorescență verde în formă monomeră și roșie, în formă asociată.

Microscopul trebuie să fie echipat cu un filtru de excitație și unul de extincție.

7.5. EVIDENȚIEREA HETEROCROMATINEI CONSTITUTIVE

A. *Bandarea „C" cu hidroxid de bariu*

a) *Soluții necesare :*

1. Soluție de HCl 0,2 N.
2. Soluție de hidroxid de bariu 5% : 5 g $Ba(OH)_2$ în 100 ml apă bidistilată. Dizolvarea hidroxidului de bariu se face pe un agitator magnetic în apa preîncălzită la care se adaugă treptat substanța, apoi se filtrează.
3. Soluție 2xSSC (NaCl 17,53 g + citrat de sodiu 8,82 g/100 ml apă distilată).
4. Soluție tampon fosfat Sörensen 0,15 M, pH 6,8.
   Soluții mamă : I = KH_2PO_4 0,15 M
   II = Na_2HPO_4 0,15 M
   Înainte de folosire, se amestecă soluțiile I și II și se corectează pH-ul la 6,8.

b) *Tratarea și colorarea preparatelor*

— Se introduce preparatul, în soluția 0,2 N de HCl timp de o oră la temperatura camerei ;
— se clătește cu apă bidistilată sau deionizată ;
— se introduce în soluția filtrată de hidroxid de bariu 5% care a fost preîncălzită într-o baie de apă termostată la 50°C și se incubează 5—10 minute (se tatonează pentru fiecare specie în parte) ;
— se clătește insistent cu apă deionizată ;
— se reincubează în soluție 2xSSC la 60°C (baie termostatată) timp de o oră, se clătește cu apă deionizată și se colorează în soluție Giemsa tamponată timp de 5—10 minute (pH 6,8).

Mențiune : colorantul Giemsa se prepară proaspăt pentru fiecare șarjă de preparate. Îndepărtarea colorantului se face cu apă de robinet.

B. *Bandare „C" cu ribonuclează*

a) *Soluții necesare :*

1. Soluție de HCl 0,2 N.
2. Soluție de ribonuclează (100 Mg/ml de 2xSSC).
3. Soluție de NaOH 0,07 N.
4. Soluție de SSC. De obicei se prepară o soluție 12xSSC care se diluiază cu apă distilată în momentul folosirii. Soluția 12xSSC = 52,6 g NaCl + 26,5 g citrat trisodic în 500 ml apă distilată.
5. Soluție Giemsa : 500 ml apă distilată + 1,5 ml acid citric 0,1 M, ajustarea pH-ului cu Na_2HPO_4 la 6,8—7,2, după care se adaugă 1,5 ml metanol pur și 5 ml Giemsa Gurr.

b) *Tratarea preparatelor*

— Se introduce preparatul în soluția de HCl 0,2 N timp de 30 minute la temperatura camerei ;
— se spală de cîteva ori cu apă distilată și se lasă să se usuce ;
— tratarea preparatului cu soluția de ribonuclează preîncălzită la 37°C într-o baie de apă termostatată în care se lasă 60 minute ;
— spălare de cîteva ori în 2xSSC, apoi în alcool etilic 70%, 95% și uscare la aer ;
— tratarea lamelor pentru 2 minute cu NaOH 0,07 N. Timpul de tratare în soluția de NaOH poate fi redus pînă la 15 secunde în funcție de specie sau de alte particularități legate de modul de obținere a preparatelor ;
— se spală imediat în cîteva schimburi de etanol de 70%, 95% pentru a stopa denaturarea ;
— se incubează în soluție 2xSSC sau 6xSSC la 65°C în baie de apă termostatată în care se lasă pînă a doua zi ;
— spălare în etanol 70%, 95% și uscare ;
— colorare în soluție Giemsa și uscare la aer (timpul de colorare este de 15—20 minute).

A. Replicarea timpurie

Evidențiază segmentele cromozomale care se replică timpuriu, care apar ca niște benzi cromozomale intens colorate.

Această metodă este descrisă pentru celulele cultivate în vitro fie pe termen scurt, fie în linii stabilizate menținute nelimitat.

7.6. METODE DE EVIDENȚIERE A ASINCRONIEI REPLICATIVE A DIFERITELOR REGIUNI ALE CROMOZOMILOR

La fiecare probă de cultură la care se dorește evidențierea replicării timpurii, se adaugă cu 2—3 ore înainte de efectuarea preparatelor, cîte 0,2 ml soluție de bromodeoxiuridină (BudR) = 1 mg BUdR la 1 ml apă distilată (filtrată prin membrană millipore). La fiecare 30 de minute înteval, se mai adaugă 0,2 ml soluție BudR pînă se sacrifică cultura. Prepararea cromozomilor se face după tehnica obișnuită.

Colorarea :

a) Soluții necesare :

1. Soluție Höechst 33258 (20 mg de Höechst 33258 la 100 ml apă bidistilată).
2. Soluție 2xSSC.
3. Soluție tampon fosfat Sörensen 0,15 M, pH 6,8.

b) Procedura de colorare : se introduce preparatul în soluția de Höechst 33258 filtrată și se lasă 3—4 secunde, se expune apoi la raze UV cu fața în sus timp de 30 minute într-un vas cu apă de robinet, se incubează o oră în 2xSSC la 62°C și se colorează cu soluția Giemsa tamponată la pU 6,8.

B. Replicarea tardivă

Evidențiază zonele cromozomale tardiv-replicative care se colorează mai intens în comparație cu cele care au încheiat procesul de sinteză.

a) *Pregătirea culturii pentru evidențierea replicării tardive*

— Soluție de 5-bromo-2-dcoxiuridină (BUdR) preparată steril sau filtrată în momentul folosirii (100 g BUdR/100 ml apă bidistilată)

— Soluție Hanks : se adaugă 9,8 Hanks în 800 ml apă distilată și 3,5 ml $NaHCO_3$ 10%, apoi se aduce pînă la 1.000 ml cu apă distilată sterilă și se corectează pH-ul la 7,2—7,4.

— Soluție de timidină : 250 Mg/ml de apă bidistilată sterilă.

Este nevoie de cel puțin 4 flacoane de cultură (limfocite sau cultură monostrat), la care se adaugă cîte 0,4 ml soluție de BUdR per 10 ml de mediu. Tratamentul cu BUdR se face în cazul culturilor limfocitare imediat după pasare. După adăugarea soluției de BUdR în condiții aseptice, se înfășoară fiecare vas de cultură cu folie de staniol și se incubează 52 de ore la 37°C. Mediul de cultură care conține BUdR va fi îndepărtat prin centrifugare sterilă la următoarele intervale de timp după tratare : 4 ore, 4,5 ore, 6 și 8 ore (pentru fiecare timp se va folosi, evident, altă probă). Se sedimentează celulele prin centrifugare și se spală cu soluție Hanks, apoi se adaugă mediu proaspăt plus soluție de Timidină : cîte 0,2 ml 10 ml de mediu. Stoparea diviziunii în metafază și efectuarea preparatelor se face după metoda clasică.

b) *Tratarea preparatelor*

Soluții necesare :

— Soluție Höechst 33258 (20 mg/100 ml apă distilată)

— Soluție 2xSSC

— Soluție tampon-fosfat Sörensen.

Colorarea se face la fel ca în cazul evidențierii replicării timpurii.

7.7. METODA SCE (SISTER CHROMATID EXCHANGES)

Dacă cromozomii sînt marcați pentru un ciclu de replicare al DNA-ului cu ^{3}H-timidină și apoi sînt lăsați să se (dividă) replice a doua oară în absența radioizotopului, ei conțin o cromatidă radioactivă și una ne-radioactivă. Acest model de marcare a permis evidențierea replicării semiconservative a cromozomilor încă din 1957 (Taylor și col.).

După anii '70, metodele de evidențiere a replicării semiconservative și a schimburilor reciproce dintre cromatidele surori, s-au îmbunătățit considerabil, oferind posibilitatea analizei cu mult mai mare precizie a acestor fenomene. Astfel, metoda SCE, face posibilă colorarea diferențiată a cromatidelor surori fără a folosi substanță radioactivă. Pentru aceasta, se tratează culturile celulare (sau indivizii) cu un analog al bazelor azotate (de obicei BUdR sau FUdR) pentru cel puțin două cicluri de diviziune după care, se colorează cu fluoracromul Höechst 33258 și Giemsa. Celulele care au suferit două cicluri de diviziune în prezența BUdR vor conține cromozomi cu o cromatidă colorată negru, iar sora ei, colorată palid. Deci, cromatidele substituite unifilar se vor colora închis, deoarece mai au o catenă veche, iar cele substituite bifilar, se vor colora deschis, deoarece au încorporat BUdR.

a) Soluții necesare :

1. Soluție de BUdR preparată steril (100 mg BUdR/100 ml apă bidistilată) păstrată la frigider în sticlă neagră.
2. Soluție 2xSSC.
3. Soluție tampon-fosfat Sörensen.

b) *Tratarea culturilor :* la fiecare tub de cultură care conține 10 ml de mediu se adaugă cîte 0,2 ml soluție de BUdR. Se înfășoară apoi vasele de cultură cu folie de staniol și se incubează atîtea ore încît să nu treacă mai mult de trei cicluri de diviziune. Deci, timpul de tratare cu BUdR se stabilește în funcție de lungimea ciclului celular al speciei în cauză. Pentru om și animalele domestice, tratarea culturilor limfocitare cu BUdR durează 40—48 de ore. Preparatele cromzomale se fac după metoda obișnuită.

c) *Colorarea :*

— se scufundă preparatul într-o soluție Höechst 33258 timp de 3—5 minute (soluția de colorare are 20 Mg Höechst/100 ml apă bidistilată).
— Se expune la lumină UV cu fața în sus într-un vas cu apă de robinet timp de 30 minute.
— Se incubează în soluție 2xSSC la 60°C timp de 60 minute.
— Se introduce în soluție Giemsa preparată astfel : 4 ml Giemsa Merck la 96 ml tampon-fosfat Sörensen 0,15 M, pH 6,8, după care se spală insistent cu apă de robinet, se includ în Eukit și se pot vizualiza oricînd.

Aspectul preparatelor colorate corect : cromozomii apar cu o cromatidă închisă și cealaltă palidă, iar între ele se pot observa schimburi reciproce de material, dînd aspect harlechinizat acelor cromozomi care au mai multe exschimburi de-a lungul lor.

Mențiune : Preparatele cromozomale obținute în același mod, se pot colora cu Acridine-orange (AO) astfel : se tratează timp de 5 mi-

nute cu 0,125 mg/ml acridine-orange (AO) în tampon fosfat (pH 6,8). După colorare, lamele sînt spălate 15 minute și montate în același tampon pentru analiză în lumină fluorescentă. Dezavantajul colorării cu AO constă în faptul că preparatele trebuie să fie analizate în primele două ore după colorare deoarece pălește fluorescența.

Aspectul preparatelor : o cromatidă apare colorată portocaliu iar sora ei, verde. Cromatida verde este cea care este unifilar substituită (întunecată), iar cea luminoasă portocalie, este cea substituită bifilar (palidă).

Metoda SCE, indiferent de colorantul folosit pentru evidențierea schimburilor reciproce dintre cromatidele surori, este foarte folositoare pentru detectarea aberațiilor cromozomale produse de dozele mici de mutageni, de tipul virusurilor, substanțelor chimice și radiațiilor ionizante. S-a determinat că, toți acești agenți mutageni produc o creștere semnificativă a frecvenței SCE-urilor per metafază, cunoscîndu-se în mare distribuția lor normală care este caracteristică fiecărei specii.

În plus, metoda este foarte sensibilă și constituie un suport în plus pentru ipoteza replicării semiconservative a DNA-ului. De asemenea, evidențiază clar structura fiecărui cromozom și anume : cromatida conține două sub-unități care au diferențe de polaritate împiedicînd reunirea lor și că ambele sub-unități ale cromatide sînt implicate într-un exchange. Deci, un exchange necesită un schimb al ambelor duplexuri de DNA, iar SCE-urile sînt generate ca o consecință a prezenței unei leziuni în timpul replicării.

PENTRU EXEMPLIFICARE vom prezenta cîteva imagini obținute prin aplicarea metodelor clasice și moderne în studiul cromozomului eucariot. În figura 203 se prezintă după John (din Rédei, 1982) cromo-

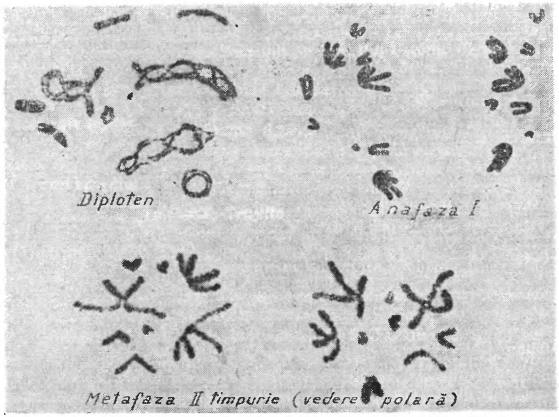


Fig. 203. **Cromozomi meiotici de *Chortippus parallelus* (după John, din Rédei, 1982).**

zomii meiotici la lăcusta *Chortippus parallelus* în diploten, anafaza I și metafaza II. Se pot distinge foarte bine chiasmele între cromozomii omologi de la nivelul bivalenților din diploten. Rezultate bune s-au obținut

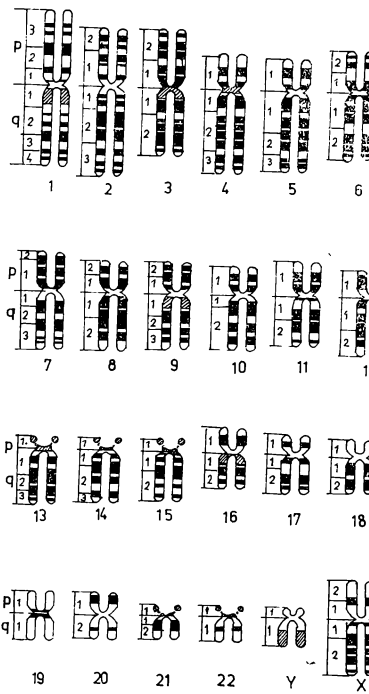


Fig. 204. Cromozomi metafazici umani (2n = 46). Model de benzi G la cromozomii umani, stabilit la Conferința de la Paris din anul 1971. p — braț lung ; q — braț scurt ; x, y — heterozomi. Cifrele din partea stîngă a cromozomilor reprezintă diferitele benzi stardard. (din H. G. Scharzacher : Chromosomes în Mitosis and Interphase. Springer-Verlag, 1976).

în studiul complementului cromozomal uman (fig. 204) dar nu în toate cazurile, mai ales în cele care au implicat restructurări de tipul inversiilor paracentrice, metoda a fost relevantă, astfel că studiul cromozo-

milor prin metodele de bandare au permis descrierea cu mai mare acuratețe atît a omologiei cromozomilor cît și a remanierilor lor.

Studiul complex pe care l-am întreprins la *Microtus epiroticus* aplicînd metodele clasice și moderne de colorare a cromozomilor ne-a per-

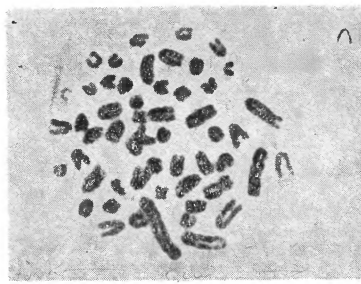


Fig. 205. Cromozomi metafazici de *Microtus epiroticus* (2n = 54). Cei mai lungi cromozomi sînt heterozomii X și Y (original). Colorare „clasică".

mis să analizăm în detaliu complementul cromozomal al acestei specii alcătuit din 54 de cromozomi (fig. 205). Tehnica de bandare G a permis relevarea modelului de bandare a cromozomilor acestei specii (fig. 206)

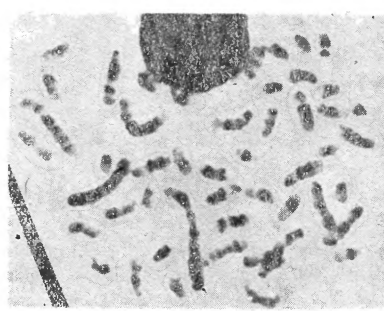


Fig. 206. Cromozomi de *M. epiroticus* prezentînd bandare G (original).

cu stabilizarea unui polimorfism cromozomal în care este implicată perechea I de cromozomi în care unul dintre cei doi cromozomi ai săi a suferit o inversie pericentrică care a anulat omologia. La această specie a fost aplicată și metoda de bandare C stabilindu-se un model caracteristic de distribuție a heterocromatinei centromerice (fig. 207). Această specie s-a dovedit a fi un obiect excelent de studiu al cromozomilor în meioză (fig. 208) analizați după colorare clasică sau prin bandare G și C.

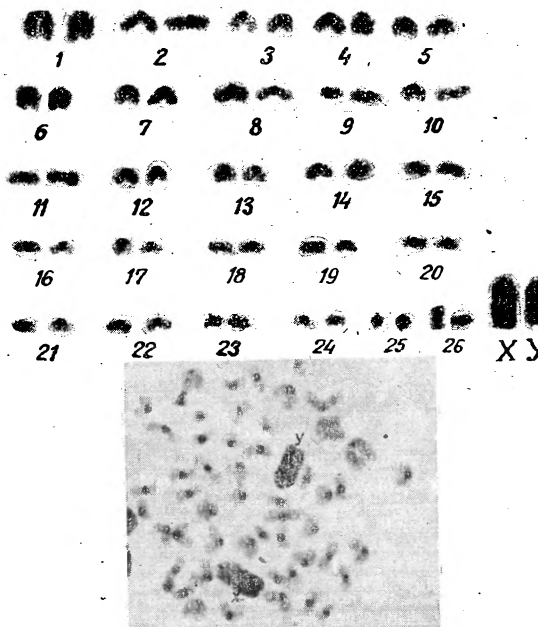


Fig. 207. M. epiroticus. Cariotip (sus) și cromozomi metafazici (jos) colorați prin bandare C. Se remarcă heterocromatinizarea integrală a cromozomului Y și pe jumătate a cromozomului X.

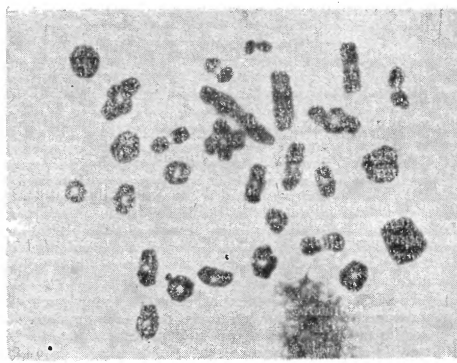


Fig. 208. M. epiroticus. Cromozomi meiotici (bivalenți) colorare „clasică".

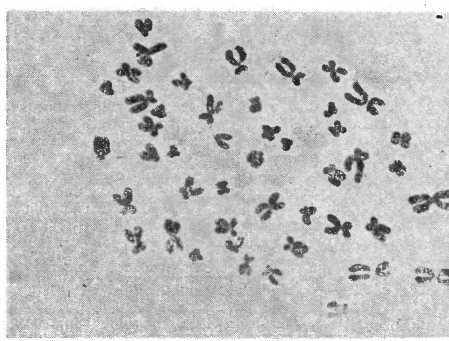


Fig. 209. Cromozomi metafazici umani (2n = 46) colorare „clasică" (din H. G. Scharzacher, 1976).

8. METODE PENTRU STUDIUL CROMOZOMILOR URIAȘI LA DROSOPHILA MELANOGASTER

În afară cromozomilor obișnuiți, care se întîlnesc la majoritatea organismelor, s-au evidențiat și alte tipuri de cromozomi somatici ; cromozomi uriași (politenici) în glandele salivare ale larvelor unor insecte — *Chironomidae, Sciuridae, Culicidae, Simulidae, Cecidomydae, Drosophilidae ;* cromozomi în formă de perie de lampă (lampbrush) în ovocitele tritonului.

E. Balbiani (1881) a evidențiat existența unor nuclei uriași în celulele glandelor salivare de la larvele de *Chironomidae, observați* ulterior și la alte insecte : *Sciuridae, Culicidae, Simulidae, Cecidomydae, Drosophilidae.*

Pentru evidențierea cromozomilor uriași la *Drosophila melanogaster* se folosesc larve din stadiul trei, bine dezvoltate. Pentru obținerea acestor larve se recomandă ca numărul de larve din vasul de cultură să fie mic și să se asigure condiții optime de creștere. Pentru aceasta se sugerează ca într-un vas să se introducă numai 1—2 perechi de genitori iar după o zi să fie îndepărtați sau transferați în alt vas cu mediu proaspăt. Culturile sînt ținute la temperatura de 16—18°C. Glandele salivare se recoltează de la larvele bine dezvoltate care ies la suprafața mediului sau aderă la peretele vasului. Pentru prelungirea stadiului larvar și pentru a împiedica transformarea în pupă, culturile trebuiesc păstrate la temperatura scăzută (+8°C). Sînt preferate larvele femele care sînt mai mari. Larvele femele conțin un cromozom X de la genitorul mascul, care poate fi marcat, identificat și studiat în descendență. Larvele masculе, au nucleii și cromozomii glandelor salivare mai mici și se evidențiază cu dificultate. Cromozomul X este mai subțire decît cromozomul X al femelei și se colorează mai puțin intens. Glandele salivare sînt localizate în partea anterioară a larvei, în imediata vecinătate a ganglionului cerebroid. Pentru disecția glandelor salivare larvele sînt plasate într-o soluție saturată de carmin acetic. La o lupă binocular sau chiar cu ochiul liber se execută disecția glandelor salivare. Cu un ac de disecție se fixează larva pe lamă iar cu un alt ac de disecție se prinde armătura bucală și se execută o mișcare în direcția axului longitudinal al larvei (fig. 210).

De obicei împreună cu glandele salivare sînt extrase și alte organe interne, în special tubul digestiv. Acestea se îndepărtează pentru a nu

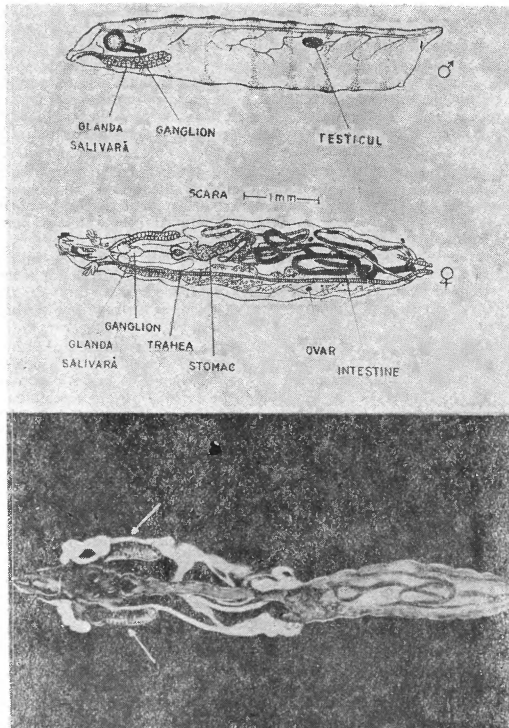


Fig. 210. Larve de *Drosophila melanogaster*, masculi și femelă, în faza în care pot fi identificate după sex (M. Demerec și B. P. Kaufman, 1961).

îngreuna studiu și se reține pe lamă numai glandele salivare. Glandele salivare se lasă în colorant 3—5 minute, după care se transferă pe o lamă curată într-o picătură de carmin acetic. Se acoperă cu o lamelă.

Excesul de colorant se îndepărtează cu ajutorul hîrtiei de filtru care se așează deasupra lamelei. Etalarea materialului se face prin presare cu degetul mare sau prin ușoare bătăi în lamelă cu un băț de chibrit.

Preparatul va fi examinat cu obiectivul cu imersie. În vederea examinării preparatului mai mult timp și pentru a evita uscarea preparatului se adaugă pe marginea lamelei cîte o picătură de carmin-acetic pe măsură ce soluția dintre lamă și lamelă se evaporă. Pentru examinarea preparatului mai multe zile se recomandă parafinarea marginilor lamelei și păstrarea la frigider.

Pentru efectuarea de preparate permanente lama și lamela se ung în prealabil cu o peliculă fină de albumină glicerinată. Se efectuează preparate de tip „squash". Albumina glicerinată fixează cromozomii uriași și evită pierderea lor în timpul efectuării preparatelor permanente. Preparatele astfel pregătite se fixează într-o poziție verticală într-un cristalizor, pe fundul căruia se găsește hîrtie de filtru îmbibată cu alcool etilic 95%, care trebuie să atingă marginea inferioară a lamelei. Preparatele sînt lăsate în cristalizorul bine acoperit, timp de 24 de ore, pentru ca sub acțiunea vaporilor de alcool să se realizeze deshidratarea materialului.

Deshidratarea se poate face prin imersionarea preparatului în alcool absolut. Cu ajutorul unei lame de ras se desprinde lamela de pe lamă. Pentru aceasta se introduce un colț al lamei de ras sub lamelă și cu o mișcare rapidă se desprinde lamela, evitînd pe cît posibil deranjarea celulelor de pe lamă. Lama și lamela se imersionează în alcool absolut și pe lamă, în zona în care se găsește preparatul se pune o picătură de euparal. Peste preparat se plasează lamela cu aceeași față care s-a aflat inițial pe lamă.

Deasupra lamelei se pune o bucată de hîrtie de filtru și prin apăsare cu degetul mic se fixează lamela și se elimină excesul de euparal. În mod frecvent preparatele se montează în balsam de Canada, euparalul fiind mai costisitor și greu de procurat. Deoarece balsamul de Canada nu este miscibil cu alcoolul, după deshidratarea materialului în alcool, lama și lamela sînt trecute prin o serie de 2—3 băi de xilol (toluen sau benzen). În fiecare baie lama și lamela sînt lăsate 2—3 minute. Înainte de a fi introduse în baia următoare lama și lamela sînt scurse pe o hîrtie de filtru. Preparatele astfel pregătite sînt lăsate cîteva zile la temperatura camerei, într-un loc ferit de praf și umezeală, eventual în cutii special confecționate, pentru a se usca. După uscare, preparatele se etichetează și pot fi folosite pentru studiu un timp îndelungat (fig. 211).

G. T. Rutkin, J. F. Aronsov, D. A. Hungerford și J. Schultz (1955) au folosit următoarea metodă pentru studiul cromozomilor uriași din glandele salivare de la *Drosophila melanogaster* (P. Raicu și col. 1973). Se execută disecția glandelor salivare și se fixează în acidul acetic 50%, timp de 3—5 minute, la temperatura camerei (20—22°C). După fixare sînt puse pe o lamă de cuarț, într-o picătură de fixator, peste care se pune o lamelă de siliciu. Se execută ușoare

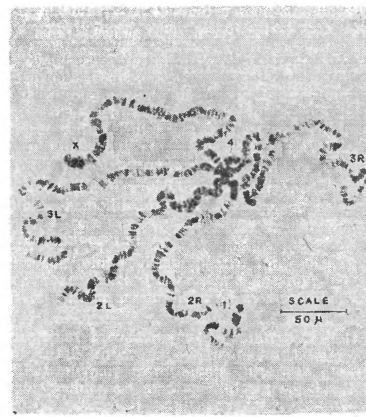


Fig. 211. Cromozomi uriași din glandele salivare de la *D. melanogaster* (B. P. Kaufman, 1961).

lovituri în lamelă, cu un act spatulat, pentru o dispersie cît mai bună a celulelor. Cu ajutorul unei hîrtii de filtru se elimină excesul de fixator. Lama se plasează pe un platou cu ghiață carbonică și după congelarea materialului se desprinde lamela cu ajutorul unei lame de bărbierit. Peste material se pune o picătură de acetat de lantan în glicerină (5% soluția apoasă saturată de acetat de lantan și 95% glicerină). Acetatul de lantan precipită acizii nucleici ca o sare de lantan. Materialul se acoperă cu o lamelă de cuarț. Se îndepărtează excesul de soluție, lamela se parafinează pentru a evita uscarea preparatului și se păstrează peste noapte la temperatura de 4—8°C. Cromozomii uriași se studiază cu ajutorul microscopului cu contrast de fază.

T. Painter (1933), E. Heitz și G. Bauer (1933) au evidențiat în nucleii uriași din celulele glandelor salivare un filament lung, cilindric și răsucit, format din șase brațe dintre care cinci lungi și unul foarte scurt unite într-un punct central — cromocentru. Deoarece cromozomii sînt uniți unul de altul în regiunea centromerului, numărul de brațe este mai mare decît numărul de cromozomi. Brațele lungi corespund la trei perechi de cromozomi, iar cel de al șaselea braț scurt corespunde perechii a patra de cromozomi. Cromozomii perechii I-a sînt uniți pe toată lungimea, astfel că în preparate ei apar sub forma unui braț. La microscopul fotonic, cromozomii uriași apar sub forma unor filamente relativ groase, pe care se observă un număr mare de benzi colorate și incolore. Benzile au o poziție și secvență relativ constantă și alternează cele colorate cu cele incolore. Cromozomii uriași, uniți radiar

în cromocentru, sînt notați astfel ; la femelă, perechea de cromozomi sexuali se notează cu X ; cu 2L și 3L brațele din stînga a perechii a doua și respectiv a treia și cu 2R și 3R brațele din dreapta perechii a doua și a treia ; cu 4 cromozomii perechii a patra. Cromozomul Y este de dimensiuni foarte reduse, încît cu greu poate fi identificat, iar cromozomul X de la mascul este mai subțire decît cromozomii X de la femelă și se colorează mai puțin intens. Fiecare braț cromozomic este constituit din doi cromozomi omologi, unul de origine maternă, altul de origine paternă. Cromozomii omologi sînt greu de identificat deoarece sînt uniți pe toată lungimea lor. Acești cromozomi pot fi identificați la organismele heterozigote. În absența omologiei genelor, cromozomii nu se împerechează perfect și în unele regiuni, cu gene ncalele, se observă o serie de bucle care se evidențiază la microscop.

Lungimea totală a cromozomilor uriași este de 1180 microni, depășind cu mult dimensiunile cromozomilor obișnuiți. Cele patru perechi de cromozomi prezintă următoarele dimensiuni ; perechea I (X) 220 microni, perechea a II-a 215 microni și 245 microni ; perechea a III-a 210 microni și 275 microni, perechea a IV-a 15 microni. În timp ce cromozomii obișnuiți sînt formați din două cromatide paralele, unite prin centromer, cromozomii uriași sînt alcătuiți dintr-un număr foarte mare de cromatide, dispuse paralel, rezultate în urma unei clivări succesive a cromatidelor, fără ca procesul de clivare să fie urmat de separarea cromatidelor. Acest fenomen se numește *politenie,* iar cromozomii sînt denumiți politeni.

Prin colorarea cromozomilor uriași cu fuxină bazică (reactivul Schiff) sau carmin acetic, s-au pus în evidență mai mult de 5000 de benzi transversale. Semnificația cromozomilor uriași a fost elucidată de G. Bridges și col. care au stabilit o corespondență între structura lor și modul de plasare a genelor pe cromozom.

9. DEMONSTRAREA EXPERIMENTALĂ A LEGILOR MENDELIENE ȘI A TEORIEI CROMOZOMICE PRIN TEHNICI DE ANALIZĂ GENETICĂ LA DROSOPHILA MELANOGASTER

Descoperirea legilor mendeliene ale segregării a însemnat un important pas înainte în studiul eredității. Progresele înregistrate în a doua jumătate a sec. XIX-lea și începutul secolului XX, au dus la descoperirea mecanismului cromozomal al eredității, punîndu-se astfel, bazele studiului eredității la nivel celular.

Prin introducerea *D. melanogaster* ca obiect de studiu în cercetările de genetică, T. Morgan și colaboratorii săi C. B. Bridges, A. H. Sturtevant, H. I. Müller au reușit să elaboreze cunoscuta teorie cromozomică a eredității, aducînd o contribuție uriașă la dezvoltarea științelor biologice.

Amintim cîteva avantaje pe care le prezintă *D. melanogaster* și care au determinat introducerea ei, ca obiect de studiu în cercetările de genetică.

— Se poate cultiva în laborator, pe medii relativ simple și ușor de pregătit;

— Se înmulțește foarte repede, o generație poate fi obținută la temperatura de 20°C, în numai 12 zile. O pereche de genitori produc cîteva sute de descendenți. În acest fel într-un an se poate studia un număr mare de generații succesive, iar numărul indivizilor cercetați într-un interval scurt de timp, este foarte mare permițînd interpretarea matematică a rezultatelor.

— Numărul de cromozomi somatici la *D. melanogaster* este relativ mic ($2n = 8$) și cromozomii pot fi ușor identificați, datorită deosebirilor lor morfologice.

— Se cunosc numeroase mutații, care afectează diferite caractere și însușiri, ce pot fi folosite pentru evidențierea unor fenomene ca transmiterea caracterelor la descendenți, sex-linkate, sex-limited etc., constituind un obiect comod de studiu.

— În afara cromozomilor somatici obișnuiți, ce se întîlnesc la marea majoritate a organismelor, s-a evidențiat existența unor cromozomi uriași, în nucleii glandelor salivare.

9.1. CICLUL DE VIAȚĂ

Dezvoltarea embrionară, are loc în interiorul membranei oului. Oul, în lungime de 0,5 mm, este de formă ovală, cu partea dorsală mai bombată decît cea ventrală. Membrana externă (corionul) este opacă și pre-

zintă un model de semne hexagonale. Anterior și dorsal oul prezintă o pereche de filamente care împiedică oul să se scufunde în mediul de cultură. Cînd oul este expulzat în uter, spermatozoidul pătrunde prin micropil în protuberanța conică de la partea anterioară. Deși pot pătrunde mai mulți spermatozoizi, numai unul participă la fecundație. Ouăle sînt depuse imediat după fecundație sau rămîn în uter un timp, unde au loc primele faze ale dezvoltării embrionare.

Stadiile larvare — Drosophila melanogaster prezintă trei stadii larvare. În stadiul trei larvar, larvele pot ajunge pînă la 4—5 mm, fiind cele mai potrivite pentru studiul cromozomilor uriași din glandele salivare (fig. 212).

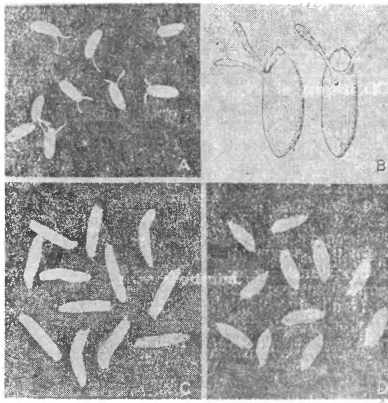


Fig. 212. Diferite stadii ale dezvoltării embrionare: A — ouă; B — ouă văzute lateral și dorsal (schemă); C — larve; D — pupe (după M. Demerec și B. P. Kaufman, 1961).

Impuparea. Înaintea impupării larvele părăsesc mediul de cultură și aderă la o suprafață relativ uscată. Pentru aceasta se recomandă introducerea în vasul de cultură a unui suport de lemn, hîrtie de filtru, carton, sticlă, material plastic sau în lipsa acestora larvele se fixează pe peretele vasului. *Drosophila melanogaster* impupează în ultimul înveliș larvar, care la început este de culoare albă și moale iar ulterior se întărește și se închide la culoare. Viața pupei durează în medie 6 zile la temperatura camerei. La sfîrșitul perioadei de pupă, insecta eclozează prin capătul anterior. La început insecta este mai alungită, cu aripile nedesfăcute, lipite de corp și are o culoare maron deschis care se închide după cîteva ore la de naștere (fig. 213).

Ciclul de viață este dependent de condițiile în care se desfășoară și în mod deosebit de temperatură. Astfel, la 20°C, ciclul de viață se des-

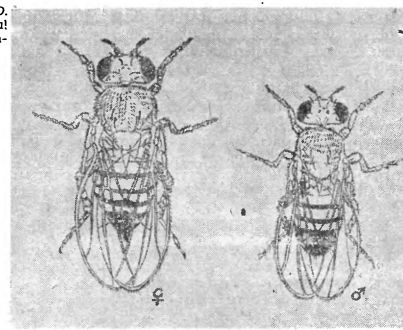


Fig. 213. Adulți de *D. melanogaster*: masculi (dreapta), femelă (stînga).

fășoară în circa 15 zile, în timp ce la 25°C, în 10 zile. Temperatura de peste 30°C determină sterilitatea sau moartea insectelor, iar temperatura scăzută prelungește ciclul vital. La 10°C ciclul de viață durează 57 zile, iar la 15°C, 18 zile. La temperatura mediului ambiant se adaugă temperatura care se degajă în timpul fermentației.

Colecția de Drosophila trebuie păstrată la o temperatură cuprinsă între 20—25°C.

9.2. METODE DE CREȘTERE ÎN LABORATOR

Drosophila melanogaster (2n = 8) este frecvent întîlnită în natură, pe fructele coapte și care au intrat în fermentație (struguri, mere, pere, etc.). În laborator, creșterea se realizează pe medii de cultură în compoziția cărora trebuie să intre zahărul și drojdia de bere. În mod frecvent, în laborator se poate folosi următorul mediu de cultură;

Mediul de mălai, denumit astfel după componenta principală mălaiul (făina de porumb).

mălai (făina de porumb)	150 g
zahăr	100 g
agar-agar	10 g
drojdie de bere	15 g
acid propionic	5 ml
apă de robinet	1000 ml

Modul de preparare

Se amestecă toate componentele și se fierb pînă se dizolvă agarul, obținîndu-se un mediu de consistența mierei de albine. Mediul astfel pregătit se toarnă în stare caldă în vase de sticlă cu diametrul de 3 cm și lungimea de 8—9 cm. confecționate din tub de sticlă, sau vase

de sticlă de 50—100 ml, într-un strat în grosime de 2—3 cm. După răcire, în fiecare vas se mai adaugă puțină drojdie de bere proaspătă pentru a grăbi declanșarea fermentației, dezvoltarea și înmulțirea drojdiei. Pentru a evita infectarea culturilor de către diferitele mucegaiuri se adaugă acid propionic sau soluție diluată de timol.

Mediul de cultură de mălai se mai poate pregăti și astfel; în cca 600—700 ml. apă se dizolvă prin fierbere, agarul. Se adaugă celelalte componente, cu excepția făinei de porumb, și se fierbe timp de 2—3 minute. În restul de apă se amestecă mălaiul și se adaugă în vasul în care se găsesc celelalte componente și se continuă fierberea, încă cîteva minute, agitîndu-se continuu, pînă cînd mediul devine semilichid. Se adaugă acidul propionic și se toarnă în vasele de cultură.

Mediul de griș prezintă următoarea compoziție;

griș	50 g
zahăr	50 g
agar-agar	10 g
drojdie de bere	15 g
acid propionic	5 ml
apă de robinet	1000 ml

În 2/3 din apă se dizolvă, prin fierbere agarul, după care se adaugă drojdia de bere și se fierbe încă 45 minute. În restul de apă se dizolvă grișul și zahărul care se adaugă în vasul în care se găsește amestecul de agar și drojdie de bere. Se continuă fierberea 15 minute pînă se obține un mediu de consistența mierei de albine. Înainte de răcire, mediul se toarnă în vasele de cultură.

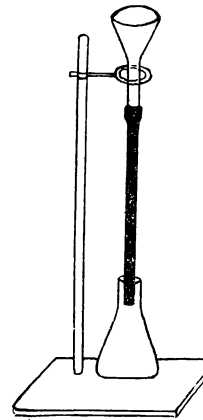
Se pot folosi de asemenea fructe coapte (mere, pere, struguri) imersionate într-o suspensie de drojdie de bere.

Pentru ca mediul de cultură să poată fi folosit cu rezultate bune trebuie să îndeplinească următoarele condiții;

— să conțină o cantitate de zahăr care să asigure hrana larvelor și insectelor adulte cît și declanșarea dezvoltării și înmulțirii drojdiei de bere.

— să fie consistent pentru a împiedicat scufundarea insectelor în mediu, în momentul eclozării (pentru solidificarea mediului se folosește agar-agar).

Operația de turnare a mediului în vasele de cultură se face cu ajutorul unui pahar Berzelius sau a unui dispozitiv confecționat astfel; la o pîlnie de sticlă cu diametru de 6—10 cm. care este fixată la un suport metalic, se atașează un furtun de cauciuc cu diametrul de 1 cm și prevăzut cu o clemă. (fig. 214). Vasele de cultură și dispozitivul de turnare se spală și sterilizează, pentru a evita infectarea culturilor. Grosimea stratului de mediu se recomandă să fie de 1,9—2 cm înainte de folosire. Vasele în care s-a turnat mediu se acoperă cu o pînză sau tifon curat. Se recomandă ca turnarea mediului de cultură să se facă cu atenție pentru a nu murdări pereții vasului. După răcire completă, pe suprafața mediului se adaugă puțină drojdie de bere proaspătă, pentru a declanșa fermentarea zahărului. Drojdia de bere se poate adăuga și sub forma unei suspensii pregătită în apă distilată sterilizată.



Vasele cu mediu se astupă cu dopuri de vată sau tifon, sterilizate. Mediul de cultură astfel pregătit poate fi păstrat mai multe zile, în frigider (+4°C).

Insectele se transferă pe alt mediu de cultură proaspăt în momentul în care drojdia de bere a început să se înmulțească și să se dezvolte. Acest moment se stabilește prin evidențierea pe suprafața mediului a unei pîsle albicioase, formată din micelul ciupercii și prin apariția unui miros caracteristic. Pentru ca un număr cît mai mare de larve să împupeze, se recomandă ca în vasul de cultură să se introducă o bucată de hîrtie, carton, material plastic, placaj, etc. lată de 2 cm., așezată înclinat la 45°. Transferarea insectelor să se facă cu multă atenție pentru a evita amestecarea insectelor din diferite linii și a asigura astfel menținerea purității genetice.

După cîteva zile, insectele femele, depun ouă care în 2—3 zile se transformă în larve. În condiții favorabile (mediul proaspăt, temperatură optimă, număr mic de genitori) larvele se dezvoltă bine și desfășoară o activitate intensă, fiind foarte vorace, deplasîndu-se pe toată suprafața mediului. Aceasta constituie indicii prețioase asupra modului în care decurge cultura.

Pentru efectuarea experiențelor în condiții optime și cu rezultate bune sînt necesare următoarele instalații și instrumente;

— Camera termostatată, cu o temperatură constantă de 20°C, în special pe timpul iernii, deoarece vara, culturile cresc foarte bine la temperatura obișnuită a camerei.

— Vase de cultură, cu următoarele dimensiuni ; diametrul de 3 cm și lungimea de 8 cm, ce pot fi confecționate din tub de sticlă. Se pot folosi și borcane de iaurt, etc.

— Lupă binoculară

— Cristalizoare, sticle de ceas, capsule de porțelan, ace spatulate ascuțite, pense, pensule etc.

— Materiale ce intră în compoziția mediului de cultură.

Pentru manipularea fiolelor cu *Drosophila,* în timpul studiilor ce se efectuează sau cînd sînt transferate dintr-un vas în altul, în vederea liniștirii lor se face o ușoară eterizare.

Eterizarea se efectuează în vase special amenajate. Ca eterizator poate fi folosit același tip de vase în care se cresc insectele sau oricare vas de sticlă cu același diametru. De dopul vasului eterizator, confecționat din plută sau cauciuc se atașează un cîrlig de care se fixează prin înfășurare sau într-un mic taler, confecționat din plasă de sîrmă, vată îmbibat cu eter etilic. Se recomandă să se folosească o cantitate mică de eter, pentru a nu omorî insectele.

Vasele în care se găsesc adulții se agită în așa fel încît toate insectele să cadă la fundul vasului. Cu o mișcare rapidă se îndepărtează dopul și se plasează în loc, vasul eterizator în care se recoltează insectele.

Insectele astfel eterizate, pot fi examinate pe o suprafață albă (carton, hîrtie albă). În cazul în care insectele prezintă anumite caractere, cum sînt ; culoarea ochilor, a corpului, ce nu pot fi bine evidențiate pe o suprafață albă se recomandă folosirea unei plăci de culoare închisă, în funcție de culoarea caracterului studiat, în așa fel încît să permită o ușoară și rapidă examinare.

Examinarea se efectuează bine cu ajutorul unei lupe binoculare sau cu un microscop stereoscopic. Pentru o mai bună observație a caracterelor care interesează studiul respectiv, insectele sînt manevrate cu o pensulă mică sau cu un as spatulat cu vîrful de cupru.

În cazul în care insectele încep să se miște, se efectuează o nouă eterizare. Această reeterizare se poate face în bune condițiuni plasînd pe placa pe care se găsesc insectele, un tampon de vată îmbibat în eter, iar apoi pentru a împiedica evaporarea rapidă a eterului și zborul insectelor, se acoperă cu capacul de la o cutie Petri sau sticlă de ceas.

La pregătirea unei noi culturi se folosesc 5—10 perechi de genitori. Alegerea femelelor și a masculilor se face după criteriile enunțate mai sus. În studiile experimentale se recomandă să se folosească femele virgine. Pentru a le recolta se folosește următorul procedeu ; a) se scot insectele bătrîne din vasul de cultură și toate femelele apărute în primele 6 ore sînt reținute pentru experiențe, fiind virgine ; b) se recoltează larvele din stadiul III sau pupe și sînt mutate în fiole de sticlă, în fiecare fiolă punîndu-se o singură larvă sau pupă.

Insectele eterizate nu trebuiesc puse imediat în vasul de cultură, pentru a evita scufundarea în mediu, înainte de a se trezi. Colecția trebuie schimbată la 3—4 săptămîni, în funcție de temperatura la care se desfășoară ciclul vital. Totdeauna se recomandă să se păstreze două culturi paralele, în eventualitatea că una s-ar înfecta sau ar muri. Tre-

buie să se lucreze cu atenție pentru a nu se amesteca insectele din diferite linii. Totdeauna să se lucreze cu o singură linie și numai cînd avem garanția că în camera în care se lucrează nu se găsesc insecte din altă linie. După alegerea genitorilor este bine să se verifice sexul * și în mod deosebit dacă aparțin liniilor luate în studiul (fig. 215).

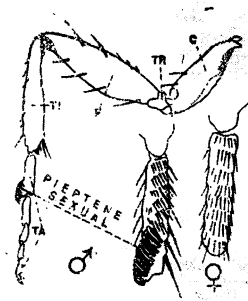


Fig. 215. Pieptenele sexual la masculul de *D. melanogaster*

Se recomandă ca toate operațiunile de montare a unei experiențe; identificarea sexului, alegerea genitorilor, calcularea rezultatelor, să se facă cu ajutorul eterizării. Fiecare vas se etichetează cu următoarele date: liniile sau mutantele ce au luat parte la experiențe, data montării experienței, cine a efectuat experiența. Înainte de apariția insectelor (după aproximativ 7—9 zile de la montarea experienței) se îndepărtează genitorii pentru a fi excluși din calcule.

9.3. ÎNCRUCIȘĂRI EXPERIMENTALE

9.3.1. MONOHIBRIDAREA

În cazul monohibridării, genitorii se deosebesc printr-o singură pereche de caractere. Pentru efectuarea acestui tip de încrucișare se re-

* În experiențele de hibridare este necesară recunoașterea sexului, la larve și adulți. Sexul larvelor se evidențiază după poziția și mărimea gonadelor. Gonadele se găsesc așezate în partea posterioară și laterală a larvei și anume în corpii grași. Testiculele larvei sînt mult mai mari decît ovarele și au o formă ovală. Evidențierea sexului în stare larvară se poate face cu ochiul liber sau cu ajutorul unei lupe binoculare. După cum este cunoscut *Drosophila melanogaster* prezintă dimorfism sexual. Insectele adulte se deosebesc după următoarele criterii: abdomenul femelei este alcătuit din 7 segmente, care se observă ușor cu ochiul liber, în timp ce la mascul se găsesc 5 segmente abdominale. Vîrful abdomenului la femelă este alungit și ceva mai rotund la mascul. La mascul, de asemenea ultimele 2 segmente sînt colorate în maron negru. Odată cu înaintarea în vîrstă a femelelor, după depunerea ouălelor, abdomenul se umflă, constituind un alt criteriu de recunoaștere a femelelor. Masculul prezintă în plus, față de femelă, așanumitul pieptene sexual, format din 10 perișori negri, rigizi, puternici, ce se găsesc pe suprafața încheieturii tarsale, a piciorului anterior (fig. 215).

comandă să se folosească insecte de tip sălbatic ce prezintă aripi de tip normal și mutanta vestigial. Înainte de începerea experiențelor trebuiesc efectuate încrucișări în interiorul fiecărei linii alese pentru a verifica constanta caracterelor. Aceste încrucișări și observații, trebuiesc efectuate în decursul mai multor generații. Iată cîteva exemple de monohibridări ;

1) Tipul sălbatec, cu aripile normale × vestigial, aripi vestigiale ($vg^+ vg^+ \times vg\ vg$)[1]
2) Tipul sălbatec, cu corpul normal colorat × cbony corp de culoare neagră ($e^+ e^+ \times e\ e$)[2]
3) Tipul sălbatec cu ochii roșii × white, cu ochii albi ($w^+w^+ \times w\ w$)[3]

Se aleg 5—6 perechi de insecte, ce constituie genitorii.

Se efectuează împerecherile propriu-zise, introducînd în același vas de cultură musculii și femelele virgine, apoi se etichetează vasele de cultură.

După 7—8 zile, timp suficient pentru depunerea unui număr mare de ouă, genitorii se transferă într-un alt vas de cultură, de rezervă, sau se îndepărtează.

Noua generație care rezultă din această încrucișare, constituie generația întîia (F_1) care este hibridă și toți indivizii rezultați sînt de tip sălbatec (cu aripile normale) fiind însă heterozigoți. La indivizii heterozigoți din F_1, care posedă ambii factori ereditari, nu se manifestă decît unul dintre ei, și anume cel dominant, în cazul experienței noastre forma normală a aripii, iar celălalt, aripi vestigiale, rămîne în stare ascunsă, fiind recesiv. În F_2 segregarea după fenotip este de 3 părți de tip sălbatec, normale și 1 parte din tip vestiginal (3 : 1) (fig. 216).

Pentru obținerea generației a doua (F_2) se procedează astfel ; se iau 5—6 perechi de insecte heterozigote din F_1 și se introduc într-un vas de cultură, cu mediu proaspăt. În acest caz nu este necesar ca femelele să fie virgine, deoarece toate insectele sînt asemănătoare, fiind heterozigote. În vazul de cultură, insectele sînt lăsate 6—7 zile, după care sînt îndepărtate. Cînd apare generația a doua (F_2) se efectuează numărătorile, care continuă timp de 7—8 zile. Datele obținute se înscriu într-un tabel. Prin autofecundarea generației a doua se obține generația a treia (F_3), la care se observă următoarele :

Din insectele de tip vestigial se obțin exclusiv insecte de acest tip. Prin autofecundarea insectelor de tip sălbatec, cu aripi normale, în generația a treia se întîlnesc două posibilități ; În cazul în care se obțin exclusiv insecte cu aripi normale se poate deduce că genitorii din F_2 au fost homozigoți. Dacă are loc segregarea în raport de 75% insecte cu aripi normale și 25% insecte de tip vestigial denotă că geni-

[1] *vg-vestigial* prezintă aripi sub forma unor rudimente (vestigii) de unde a primit și denumirea.
[2] *e-ebony*, culoarea corpului neagră strălucitoare, mult mai închisă decît a tipului sălbatic.
[3] *w-white*, au ochii de culoare albă ca zăpada.

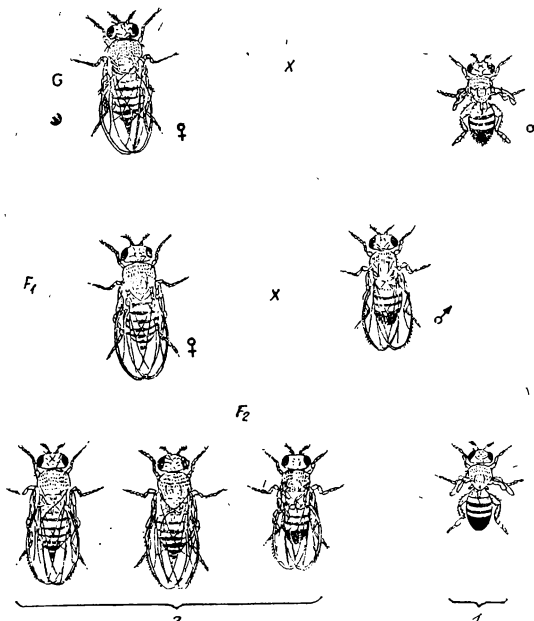


Fig. 216. Schema unei monohibridări între *D. melanogaster* de tip sălbatic (cu aripi normale) și insecte cu aripi vesitgiale.

torii F_2 au fost heterozigoți, dar fenotipic prezentau aripi normale, caracter determinat de o genă deminantă. Deci insectele heterozigote din F_2 se comportă în F_3 la fel cum se comportă hibrizii din prima generație.

Insectele heterozigote din F_1 se încrucișează cu genitorii homozigoți, realizîndu-se astfel un back-cross sau retroîncrucișare. Astfel femelele virgine din F_1 pot fi împerecheate cu masculi de tip vestigial, sau femele virgine de tip vestigial se încrucișează cu masculi din F_1. În fiecare vas de cultură, cu mediu proaspăt pregătit se pun 5—7 perechi

de insecte. După 6—7 zile, genitorii se îndepărtează. Cînd apar insectele se stabilește cîte sînt de tip sălbatec și cîte de tip vestigial. Aceste calcule se efectuează timp de 7—8 zile, iar datele obținute se înscriu într-un tabel. Dacă insectele hibride din F_1 se împerechează cu insectele de tip sălbatec (back-cross) se obține în F_2 numai insecte cu aripi normale, din care 50% homozigote și 50% heterozigote. Din contră dacă insectele heterozigote din F_1 se împerechează cu insecte de tip vestigial, în generația a doua F_2, jumătate din insecte sînt cu aripi normale dar heterozigote și jumătate cu aripi vestiginale, fiind homozigote (fig. 217). Rezultate similare se obțin și în cazul în care se iau în considerație alt caracter ca de pildă culoara ochilor ($w^+ w^+ \times w\ w$) (Fig. 218).

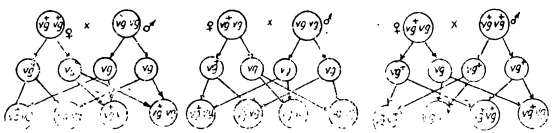


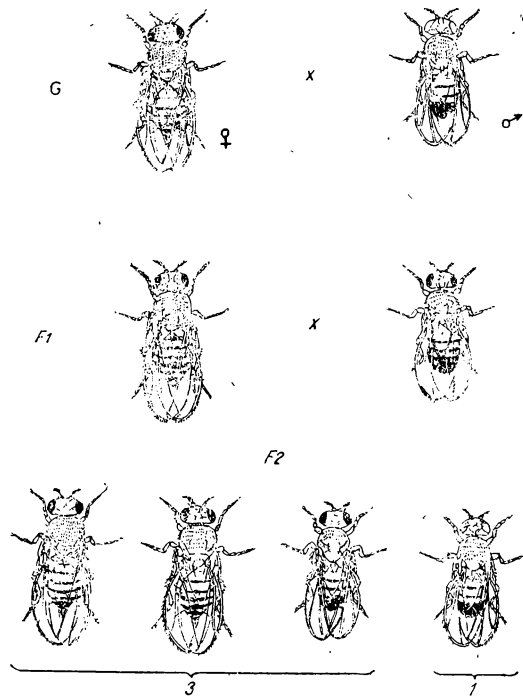
Fig. 217. Reprezentarea schematică a retroîncrucișării organismelor heterozigote din F_1 cu genitori homozigoți pentru tipul normal (dreapta) și homozigoți pentru gena recesivă (mijloc).

9.3.2. DIHIBRIDAREA

Prin metoda încrucișărilor dihibride se poate demonstra modul cum se transmit carctorele, cînd organismele se deosebesc prin două perechi de caractere.

Pentru încrucișări dihibride folosim mutante ce se deosebesc prin două perechi de caractere, *vestigial* (mutantă determinată de o genă plasată pe cromozomul II) ce se caracterizează prin aripi foarte mici, iar ochii normal colorați și mutante white, ce prezintă ochi de culoare albă (determinată de o genă plasată pe cromozomul I). Insectele de tip white prezintă aripi normal dezvoltate. Hibrizii din prima generație provenîți din părinți ce se deosebesc prin două perechi de caractere, formează patru tipuri de gameți femeli și patru tipuri de gameți masculi. Prin combinarea acestor gameți rezultă 16 combinații, care reprezintă segregarea în cazul încucișării părinților ce se deosebesc prin două perechi de carctere, ce se realizează astfel : 9 : 3 : 3 : 1 (fig. 219).

Pentru efectuarea acestui tip de încrucișare se procedează astfel : se stabilesc caracterele care urmează să fie studiate ; se aleg genitorii avînd grijă ca femelle să fie virgine și să efectuează împerecherile. După 6—7 zile se îndepărtează genitorii sau se transferă într-un vas cu mediu proaspăt, de rezervă. Apoi se iau cîteva perechi de insecte hibride din F_1, care se împerechează. Genitorii sînt lăsați în vasul de cultură, 6—7 zile, după care sînt îndepărtați sau transferați în alt vas de cultură. După apariția insectelor, se efectuează calcule, iar rezultatele se centralizează într-un tabel.



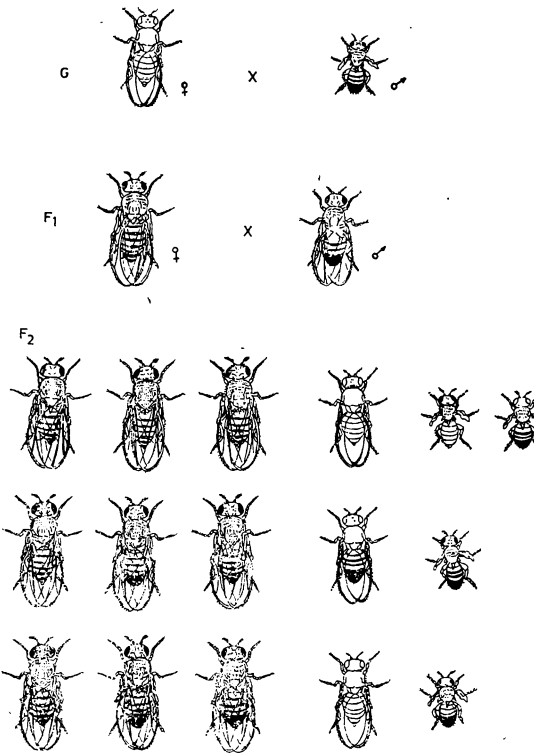
Schema unei monohibridări între insecte de tip sălbatic (cu ochi roşii) şi insecte mutante cu ochi albi.

9/16 insecte normale (prezintă cele două caractere dominante — ochi roşii şi aripi normale)

3/16 insecte cu un caracter dominant (ochi roşii) şi un caracter recesiv (aripi vestigiale)

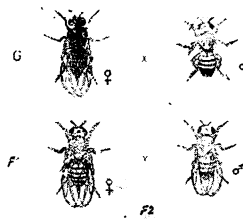
3/16 insecte cu un caracter recesiv (ochi albi) şi un caracter dominant (aripi normale)

1/16 insecte cu ambele caractere recesive (ochi albi şi aripi vestigiale).



Se pot efectua și alte tipuri de încrucișări ca de exemplu : insecte ebony (corp negru și aripi normale cu insecte vestigiale (aripi vestigiale și corp gri) ; rezultatele fiind aceleași 9 : 3 : 3 :1 (fig. 220).

♀ \ ♂	w+ vg+	w+ [illegible]	w vg+	w vg
w+ vg+	w+ vg+ / w+ vg+	w+ vg+ / w+ vg	w+ vg+ / w vg+	w+ vg+ / w vg
w+ vg	w+ vg / w+ vg+	w+ vg / w+ vg	w+ vg / w vg+	w+ vg / w vg
w vg+	w vg+ / w+ vg+	w vg+ / w+ vg	w vg+ / w vg+	w vg+ / w vg
w vg	w vg / w+ vg+	w vg / w+ vg	w vg / w vg+	w vg / w vg



9.3.3. TRIHIBRIDAREA

În acest tip de încrucișare, organismele se deosebesc prin trei perechi de caractere. Se pot folosi insecte din linia *ebony-vestigial-cinnabar* (eb vg cn/eb vg cn) care se încrucișează cu insecte de tip sălbatec

(+++/+++). Insectele din F_1 (femele și masculi) după fenotip sînt normale, dar heterozigote (eb vg cn/+++) și formează 8 tipuri de gameți femeli și 8 tipuri de gameți masculi +++ ; ++ eb ; + vg + ; cn ++ ; +eb vg ; eb + cn ; vg cn + ; eb vg cn. Prin unirea pe bază de hazard a acestor gameți, se formează 64 de combinații și 8 tipuri de organisme.

eb vg cn/eb vg cn ♀ x +++/+++ ♂

F_1 eb vg cn/+++

♂ / ♀	+++	eb ++	+ vg +	++ cn	eb vg +	+ vg cn	eb + cn	eb vg cn
+++	+++ +++	eb ++ +++	+ vg + +++	++ cn +++	eb vg + +++	+ vg cn +++	eb + cn +++	eb vg cn +++
eb ++	+++ eb ++	eb ++ eb ++	+ vg + eb ++	++ cn eb ++	eb vg + eb ++	+ vg cn eb ++	eb + cn eb ++	eb vg cn eb ++
+ vg +	+++ + vg +	eb ++ + vg +	+ vg + + vg +	++ cn + vg +	eb vg + + vg +	+ vg cn + vg +	eb + cn + vg +	eb vg cn + vg +
++ cn	+++ ++ cn	eb ++ ++ cn	+ vg + ++ cn	++ cn ++ cn	eb vg + ++ cn	+ vg cn ++ cn	eb + cn ++ cn	eb vg cn ++ cn
eb vg +	+++ eb vg +	eb ++ eb vg +	+ vg + eb vg +	++ cn eb vg +	eb vg + eb vg +	+ vg cn eb vg +	eb + cn eb vg +	eb vg cn eb vg +
+ vg cn	+++ + vg cn	eb ++ + vg cn	+vg+ + vg cn	++ cn + vg cn	eb vg + + vg cn	+ vg cn + vg cn	eb + cn + vg cn	eb vg cn + vg cn
eb + cn	+++ eb + cn	eb ++ eb + cn	+ vg + eb + cn	++ cn eb + cn	eb vg + eb + cn	+ vg cn eb + cn	eb + cn eb + cn	eb vg cn eb + cn
eb vg cn	+++ eb vg cn	eb ++ eb vg cn	+ vg + eb vg cn	++ cn eb vg cn	eb vg + eb vg cn	+ vg cn eb vg cn	eb + cn eb vg cn	eb vg cn eb vg cn

1) 27/64 normale (insecte ce prezintă trei carctere dominante (+++).

2) 9/16 ebony (insecte cu două carctere dominante și unul recesiv (eb ++).

3) 9/64 vestiginal (insecte cu două caractere dominante și unul recesiv (+ vg +).

4) 9,64 cinnabar (insecte cu două caractere dominante și unul recesiv (+ + cn).

5) 3,64 ebony-vestigial (insecte ce prezintă un caracter dominant și două recesive (eb vg +).

6) 3/64 ebony-cinnabar (insecte cu un caracter dominant și două recesive (eb + cn).

7) 3/64 vestigial-cinnabar (un caracter dominant și două recesive (vg + cn).

8) 1/16 ebony-vestigial-cinnabar (trei caractere recesive (eb vg cn).

Pe baza acestor experiențe se poate enunța cea de a doua lege a lui Mendel ; *legea liberei combinări a factorilor ereditari* sau *legea segregării*

independente a perechilor de caractere. Conform acestei legi, factorii ereditari pereche (alele) segregă independent de alți factori ereditari și prin combinarea lor pe bază de probabilitate ; raportul de segregare în F_2 este de 9 : 3 : 3 : 1, în cazul a două perechi de caractere și 27 : 9 : 9 : 9 : 3 : 3 : 3 : 1 în cazul a trei perechi de caractere.

9.4. INTERPRETAREA MATERATICĂ A REZULTATELOR EXPERIMENTALE

Pentru estimarea probabilității cu care s-ar obține rezultate similare în cazul repetării experimentului se aplică calculul probabilității folosindu-se tabelul lui *R. A. Fischer.*

În cazul unei încrucișări între indivizi ce se deosebesc prin două perechi de caractere, ca de exemplu, insecte de tip sălbatec cu ochi roșii și aripi normale și insecte mutante cu ochi albi și aripi vestigiale în F_1 se obțin numai insecte cu caracterele tipului sălbatec (ochi roșii și aripi normale — caractere dominante) dar heterozigote, iar prin încrucișarea acestora s-au obținut următoarele rezultate : 594 insecte de tip sălbatec cu ambele caractere dominante (ochi roșii și aripi normale) ; 196 insecte cu aripi vestigiale și ochi roșii (un caracter recesiv și unul dominant) ; 200 insecte cu ochi albi și aripi normale (un caracter recesiv și unul dominant) și 71 insecte cu ambele caractere recesive (ochi albi și aripi vestigiale).

Pentru a stabili dacă această segregare are un caracter pur întîmplător sau reflectă o legitate a segregării se aplică testul hi pătrat (χ^2) pentru a compara distribuția teoretică a fenomenului cu cea experimentală

$$\chi^2 = \frac{d^2}{e} \text{ în care :}$$

d = diferență între valoarea calculată și cea observată
e = valoarea calculată a fenomenului
Σ = semnul de însumare

Datele	Numărul de insecte			
	Ochi roșii și aripi normale	Ochi roșii și aripi vestigiale	Ochi albi și aripi normale	Ochi albi și aripi vestigiale
Observate	631	211	206	68
Calculate	627,75	209,25	209,25	69,75
Diferența (d)	3,25	1,75	3,25	1,75
d^2	10,562	3,06	10,562	3,06
$\frac{d^2}{e}$	0,168	0,014	0,05	0,04
$\Sigma \frac{d^2}{e}$	0,272			

Insecte cu două caractere dominante (ochi roşii şi aripi normale) trebuie să apară în proporţie de 9/16. Numărul total de insecte analizate a fost de 1116 (631 + 211 + 206 + 68). Dacă din 16 insecte — 9 vor fi cu ochi roşii şi aripi normale din 1116 . . . x.

$$x = \frac{1116 \times 9}{16} = 627{,}75$$

Insecte cu ochi roşii şi aripi vestigiale trebuie să apară în proporţie de 3/16. Dacă din 16 insecte 3 vor fi cu ochi roşii şi aripi gestigiale din 1116 . . . x.

$$x = \frac{1116 \times 3}{16} = 209{,}75$$

În acelaşi mod se calculează valorile teoretice pentru celelate combinaţii (ochi albi şi aripi normale, ochi albi şi aripi vestigiale).

Tabelele lui *R. A. Fischer*, indică în procente probabilitatea pentru valorile cu χ^2, ţinînd seama de numărul de grade de libertate care este egal cu numărul de clase independente de indivizi minus unul. În cazul nostru, numărul de clase de indivizi apărute în urma segregării este egal cu 4, iar al gradelor de libertate este deci egal cu 3.

Valoarea lui χ^2 calculată este 0,272 şi este cuprinsă între 0,21 şi 0,45 ceea ce corespunde probabilităţii P = 0,80 şi P = 0,90.

Tabelul lui R. A. Fisher pentru estimarea probabilităţii în cazul a diferite valori pentru χ^2

Numărul gradelor de libertate	Valorile lui P									
	0,99	0,95	0,90	0,80	0,70	0,50	0,30	0.10	0,05	0,01
1	0,002	0,004	0,016	0.064	0,15	0,46	1,1	2,7	3,8	6,6
2	0,02	0.10	0,21	0,45	0,71	1,39	3,4	4,6	6,0	9,2
3	0,12	0,35	0,58	1,01	1,42	2,37	3,7	6,3	7,8	11,3
4	0,30	0,71	1,06	1,65	2,20	3,36	4,9	7,8	9,5	13,3
5	0,55	1,14	1,61	2,34	3,00	4,35	6,1	9,2	11,1	15,1
6	0,87	1,63	2,20	3,07	3,83	5,35	7,2	10,6	12,6	16,8
7	1,24	2,17	2,83	3,82	4.67	6,35	8,4	12,0	14,1	18,5
8	1,65	2,73	3,49	4,59	5,55	7,34	9 5	13,4	15,5	10,1
9	2,09	3,32	4,17	5,38	6,39	8,34	10,6	14,7	16,9	21,7
10	2,56	3,94	4,87	6.18	7,27	9,34	11,8	16,0	18,3	23,2

Se poate deci spune că în cazul repetării experienţei se vor obţine rezultate similare în 80—90% din cazuri iar ipoteza potrivit căreia segregarea a două perechi de caractere are loc în raport de 9 : 3 : 3 : 1 este adevărată.

9.5. EVIDENŢIEREA FENOMENULUI DE ÎNLĂNŢUIRE A GENELOR PLASATE PE ACELAŞI CROMOZOM (FENOMENUL DE LINKAGE)

Experienţele de încrucişare şi cartare genetică au dus la concluzia că pe fiecare cromozom există un număr mai mare de gene şi că ele se transmit la descendenţi, împreună. Acest fenomen se numeşte *linkage* (înlănţuire).

Pentru a demonstra fenomenul de linkage, între două gene plasate pe acelaşi cromozom se procedează astfel : se împerechează de

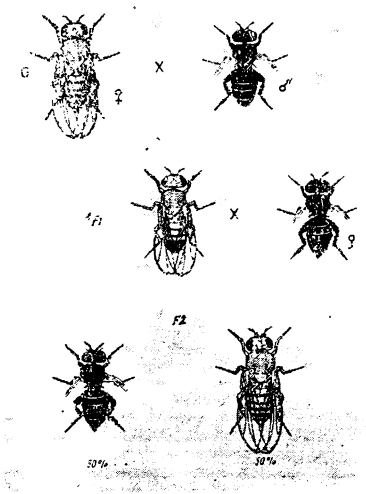
pildă insecte de tip sălbatec cu insecte ce prezintă două mutante recesive black și vestigial determinate de gene ce sînt plasate pe cromozomul I (corp negru și aripi vestigiale). Se lasă împreună 2—3 zile pentru a depune un număr suficient de ouă, după care se transferă în alt vas de cultură, de rezervă, sau se îndepărtează.

$$b^+vg^+/b^+vg^+ \quad x \quad b\ vg/b\ vg$$

$$\downarrow$$

$$b^+vg^+/b\ vg \text{ (insectele din } F_1)$$

Prin încrucișarea femelelor mutante black-vestigial cu masculi heterozigoți din F_1 (++/b vg) în loc ca în F_2 să se obțină, potrivit legilor mendeliene, 4 clase de indivizi (1 de tip sălbatec — cu aripi normale și corp gri ; 2 — aripi normale și corp negru ; 3 — aripi vestiginale și corp gri și 4 — aripi vestiginale și corp negru, în raport de 9 : 3 : 3 : 1 s-au obținut numai 2 clase de indivizi de tip sălbatec (aripi normale și corp gri) și insecte cu aripi vestigiale și corp negru, în proporție de 1 : 1. Acest lucru se datorește plasării celor două gene care determină caracterul de aripi vestigiale și corp negru, pe același cromozom și se transmit împreună (fig. 221).



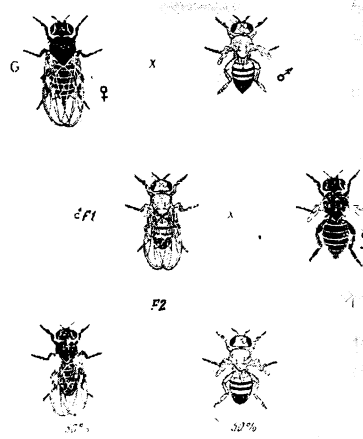
$b\ vg\ b\ vg^+\ ♀ \times b^+vg^+/b\ vg\ ♂$

↓

$b^+vg^+/b\ vg$ și $b\ vg/b\ vg$

50% insecte de tip sălbatic dar heterozigote — 50% insecte mutante cu aripi vestigiale și corp negru.

Prin încrucișarea unor insecte cu corp negru și aripi normale cu insecte cu aripi vestigiale și corp gri se obțin rezultate similare (fig. 222).



9.6. EVIDENȚIEREA EFNOMENULUI DE INTERACȚIUNE A GENELOR

Interacțiunea genelor este un fenomen ce determină modificarea tipului mendelian de segregare sau apariția la descendenți a unor fenotipuri ce nu au existat la genitori.

Pentru evidențierea fenomenului de interacțiune a genelor se încrucișează insecte de tip black, caracter determinat de o genă plasată pe cromozomul II cu mutanta *ebony*, determinată de o genă ce se găsește pe cromozomul III. Prin încrucișarea insectelor din F_1 heterozigote (b +/+ e) se obține F_2, în care raportul de segregare este de 9 : 7 (9 părți din insecte sînt de tip sălbatic iar 7 părți din insecte sînt cu corpul negru).

Aceasta arată că raportul mendelian de segregare în cazul a două perechi de caractere de 9 : 3 : 3 : 1, s-a modificat în 9 : 7, datorită faptului că fenotipic clasele de indivizi 3/16 + 3/16 + 1/16 (black, ebony și black-ebony) sînt identice, avînd corpul colorat în negru. Datorită fenomenului de interacțiune a genelor pot apare în F_2 și alte tipuri de segregare (fig. 223). Astfel, dacă în încrucișarea precedentă am lua în

(black × ebony)

II III II III

PP: ♀ $\frac{b}{b}$ $\frac{+}{+}$ × ♂ $\frac{+}{+}$ $\frac{e}{e}$

GAMEȚI PP: ♀ b + ♂ + e

F1: ♀♀ și ♂♂ $\frac{b}{+}$ $\frac{+}{e}$

GAMEȚI F1:

♂ \ ♀	+ +	+ e	b +	b e
+ +	$\frac{+}{+}$ $\frac{+}{+}$	$\frac{+}{+}$ $\frac{e}{+}$	$\frac{b}{+}$ $\frac{+}{+}$	$\frac{b}{+}$ $\frac{e}{+}$
+ e	$\frac{+}{+}$ $\frac{+}{e}$	$\frac{+}{+}$ $\frac{e}{e}$	$\frac{b}{+}$ $\frac{+}{e}$	$\frac{b}{+}$ $\frac{e}{e}$
b +	$\frac{+}{b}$ $\frac{+}{+}$	$\frac{+}{b}$ $\frac{e}{+}$	$\frac{b}{b}$ $\frac{+}{+}$	$\frac{b}{b}$ $\frac{e}{+}$
b e	$\frac{+}{b}$ $\frac{+}{e}$	$\frac{+}{b}$ $\frac{e}{e}$	$\frac{b}{b}$ $\frac{+}{e}$	$\frac{b}{b}$ $\frac{e}{e}$

Fig. 223. Schema unei hibridări între tipul black și tipul ebony.

considerație încă o genă, ce se referă tot la culoarea corpului, cu o acțiune asemănătoare genelor black și ebony în clasa insectelor închise la culoare, vor fi incluse toate noile combinații ce rezultă în urma unei încrucișări trihibride. Ca urmare raportul tipic mendelian de segregare 27 : 9 : 9 : 9 : 3 : 3 : 3 : 1 se reduce la 27 insecte normal (corpul cenușiu) 37 insecte închise la culoare.

Prin încrucișarea unor insecte mutante *Lobe* și *eyeless*, determinate de gene ce se găsesc plasate pe cromozomul II și respectiv pe cromozomul IV, segregarea în F_2 se deosebește esențial de tipul mendelian. Din prezentarea schematică a acestei încrucișări, se observă că 3 clase din 16 (care nu prezintă gena dominantă *Lobe* și nici gena *eyeless* în stare homozigotă) au ochi normali, nereduși.

Toate celelalte clase de insecte (13 din 16) prezintă gena *Lobe*, în stare homozigotă sau heterozigotă, sau gena *eyeless* în stare homozigotă și ca urmare vor prezenta ochi reduși ca mărime.

Raportul de segregare mendelian 9 : 3 : 3 : 1, reprezentat prin 4 fenotipuri, se reduce la două : 13 (ochi reduși), 3 (ochi normali). Se poate

ușor observa că dacă gena *eyeless* ar fi dominantă numai 1 din 16 combinații vor avea ochi normali, iar raportul de segregare s-ar modifica în 1 : 15.

Interacțiunea genelor determină nu numai modificarea raportului mendelian de segregare ci și apariția unor fenotipuri noi, deosebite de ale genitorilor. Prin încrucișarea a două mutante, *brown*, determinată de o genă localizată pe cromozomul II și *vermilion*, genă plasată pe cromozomul I, în F_1 toate insectele prezintă ochi roșii, fiind deosebiți de ai genitorilor (brown și respectiv vermilion). În F_2 ar trebui în mod normal, în cazul acestei încrucișări (br +/+ v) să apară 4 combinații, în raport de 1 : 2 : 1 (1 ochi roșii, 2 ochi cafenii, 1 ochi vermilion). În realitate, pe lîngă acestè 3 tipuri de organisme au apărut și insecte cu ochi albi, iar segregarea s-a produs în raport de 9 : 3 : 3 : 1, apărînd și fenotipuri noi (ochi albi și ochi roșii) ce nu se întîlnesc la genitori. Fenotipic, F_2 se prezintă astfel : 9/16 insecte cu ochi roșii ; 3/16 insecte de tip vermilion (ochi colorați în roșu deschis) ; 3/16 insecte de tip brown (ochi cafenii) și 1/16 white (ochi albi). Din acest exemplu, reiese că din interacțiunea celor două gene în stare dominantă apare un nou tip de insecte și anume insecte de tip sălbatec, cu ochi roșii, iar din interacțiunea celor două gene în stare recesivă apar insecte cu ochi albi, ambele tipuri deosebindu-se de genitori. Din punct de vedere biochimic, fenomenul de interacțiune a genelor, în cazul expus mai sus, poate fi explicat astfel : culoarea ochilor este determinată de prezența unor pigmenți și copigmenți. Pe lîngă aceștia sînt două gene dominante A și B care determină apariția culorii roșii. Absența oricăreia din cele două gene dominante A și B are ca rezultat blocarea lanțului proceselor biochimice care duc la apariția culorii și ca urmare ochii rămîn albi.

9.7. EVIDENȚIEREA FENOMENULUI DE CROSSING-OVER

Studiul mecanismului de transmitere ereditară a arătat că nu întotdeauna genele ce fac parte din aceeași grupă de linkage se transmit înlănțuite ci există o serie de excepții. Pentru explicarea acestor excepții s-a ajuns la concluzia că între cromozomii pereche are loc un schimb de gene, adică o recombinare genetică, fenomen care a primit denumirea de crossing-over.

Prin încrucișarea unei femele de *D. melanogaster* ce prezintă concomitent două mutații recesive : corp galben (y) și ochi albi (w) determinate de gene plasate pe cromozomii sexului XywXyw, cu un mascul cu corp gri și ochi roșii X y^+ w^+ Y, în F_1 s-au obținut : femele de tip sălbatec dar heterozigote (X y w X y^+ w^+) și masculi ce prezentau ambele mutante (X y w Y). Prin încrucișarea indivizilor din F_1 s-au obținut F_2, în care indivizii erau reprezentați astfel :

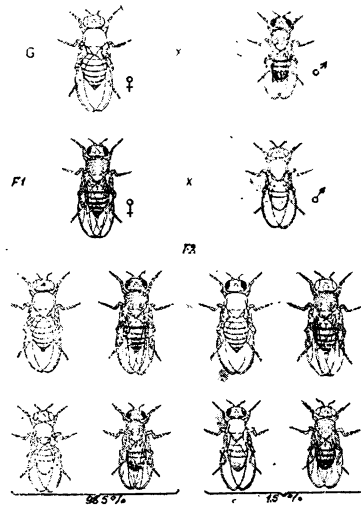
Genitorii $\frac{y\ w}{y\ w}$ ♀ $\frac{+\ +}{\quad}$ ♂

Gameții y w x + + ♂

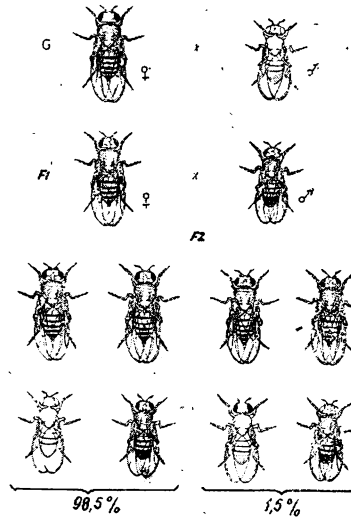
F_1 $\frac{y\ w}{+\ +}$ ♀ $\frac{y\ w}{\quad}$ ♂

F_2

98% din insecte sînt identice cu genitorii (corp gri și ochi roșii 49,25% sau corp galben și ochi albi — 49,25%). 1,5% din insecte au rezultat în urma unei recombinări între genele plasate pe cromozomul X, avînd un caracter de la tipul sălbatec și altul mutant (corp gri și ochi albi sau corp galben și ochi roșii) (fig. 224 și 225).



În mod normal trebuia să rezulte în proporții egale femele și masculi cu corp galben și ochi albi (50%), corp gri și ochi roșii (50%). Din date rezultă că au apărut însă în proporții reduse (1,5%) femele și masculi cu corp galben și ochi roșii sau corp gri și ochi albi. Aceasta înseamnă că între genele y și y^+ și între w și w^+ s-a produs o recombinare datorită faptului că genele y w plasate pe un cromozom X și y^+w^+ plasate de celălalt cromozom X nu s-a transmis înlănțuit ci s-au separat una de alta. Astfel, în loc ca descendenții să fie de tip sălbatec sau să prezinte concomitent două mutații au apărut și indivizii la care cele două gene y w s-au separat și prezentau o singură mutație (corp galben sau ochi albi). Această recombinare se datorește fenomenului de crossing-over.

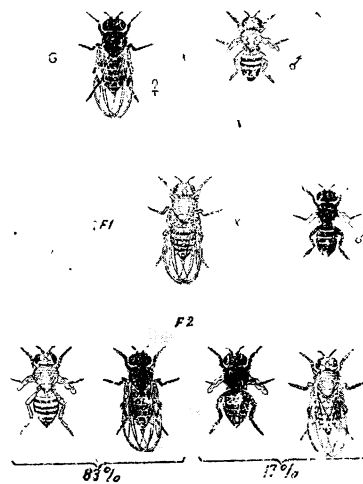


Fenomenul de crossing-over se manifestă și la genele de pe autozomi.

S-a studiat modul de transmitere ereditară a caracterelor la două mutante, ale căror gene erau plasate pe perechea II de cromozomi, aripi vestigiale (vg) și corp normal colorat (b^+) și altele cu aripi normale (vg^+) și corp negru (b).

Prin încrucișarea femelei vg^+b/vg^+b cu un mascul vgb^+/vgb^+ în F_1 au apărut numai indivizi de tip sălbatec (aripi normale și corp colorat normal, fiind caractere dominante). O femelă din F_1 a fost retroîncrucișată (black-cross) cu un mascul ce prezintă ambele mutante (aripi vestigiale și corp negru (vgb/vgb) (fig. 226).

În mod normal trebuia să rezulte în proporții egale indivizi cu aripi vestigiale și corp normal (50%) și aripi normale și corp negru (50%).



Au rezultat însă 41,5% indivizi cu aripi vestigiale și corp normal ; 41,5% cu aripi normale și corp negru, 8,5% cu aripi vestigiale și corp negru și 8,5% cu aripi și corp normale.

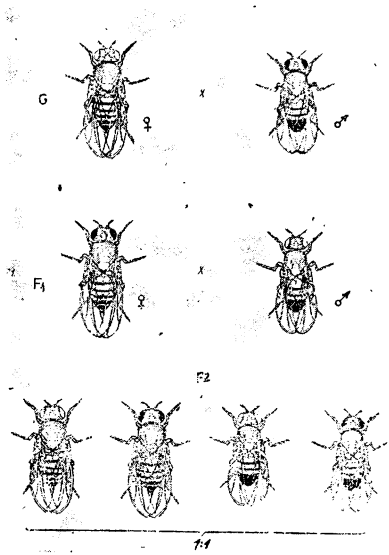
Apariția acestor două categorii de indivizi se datorește unui fenomen de recombinare genetică datorită schimbului de gene între cromozomii pereche.

9.8. EVIDENȚIEREA FENOMENULUI DE SEX-LINKAGE

Studiul mecanismului cromozomal al determinării sexelor a permis descoperirea faptului că unele caractere se transmit la descendenți legate de un anumit sex (fenomenul sex-linkage). Acest fenomen se poate studia prin încrucișarea unor femele cu ochi roșii heterozigote (w^+w)[1] din F_1 cu masculi cu ochi albi. Din această încrucișare rezultă 50% indivizi cu ochi roșii, dintre care 1/2 femele și 1/2 masculi și 50% indivizi cu ochi albi, dintre care 1/2 femele și 1/2 masculi. Din aceste experiențe s-a tras concluzia că gena w ce determină caracterul de „ochi

[1] cu ochi roșii (tip salbatec).

albi" este plasată pe cromozomul X, întrucît transmiterea sa din generație în generație urmează calea transmiterii cromozomului X, provenit de la organismul cu ochi albi (fig. 227).



Deoarece cromozomul X determină și sexul, avem de-a face cu un fenomen de transmitere ereditară a unui caracter legat de cromozomii sexului (sex-linkage).

10. LUCRĂRI PRACTICE DE FIZIOLOGIE ANIMALĂ

În materialul ce urmează, vom prezenta modul de realizare a celor mai semnificative lucrări practice de fiziologie animală care pot fi efectuate în orice laborator școlar.

Lucrările practice descrise ilustrează o serie de fenomene fiziologice din domeniul funcțiilor de relație, nutriție și reproducere.

10.1. FIZIOLOGIE NEURO-MUSCULARĂ

Pentru demonstrațiile și lucrările practice referitoare la activitatea mușchilor somatici și nervilor se folosesc în mod obișnuit preparate neuro-musculare. Acestea sînt alcătuite dintr-un mușchi extras din organism, împreună cu trunchiul nervos care îl inervează. Cel mai adesea, aceste preparate provin de la animalele poikiloterme (în special, de la broască), întrucît acestea nu reclamă condiții speciale pentru menținerea proprietăților lor fiziologice.

1. Efectuarea preparatului neuro-muscular sciatic-gastrocnemian.

Cu ajutorul preparatului neuro-muscular menționat, pot fi studiate, atît proprietățile fiziologice ale mușchilor (elasticitatea, excitabilitatea și contractilitatea), cît și ale nervilor (excitabilitatea și conductibilitatea).

Materialele necesare: broască, foarfece, pensă, baghetă și lamă de sticlă, ață, vată, ace cu gămălie, plăcuță cu plută sau vas de disecție și soluție de NaCl 6,5‰ pentru vertebratele poikiloterme.

Modul de lucru. Pentru realizarea preparatului, broasca trebuie mai întîi paralizată, prin distrugerea axului cerebro-spinal, procedîndu-se în felul următor. Se apucă broasca cu mîna stîngă, iar cu degetul arătător i se înclină capul în înainte, cu un unghi de 40°—50°C (Fig. 229). În articulația craniо-vertebrală (punctul de intersecție a axului longitudinal cu linia imaginară ce unește baza celor două timpane) (Fig. 230) se introduce, perpendicular, vîrful unui ac cu gămălie. Se orientează apoi acul spre partea anterioară și se introduce în cutia craniană, distrugîndu-se encefalul prin mișcări de latcralitate. După aceasta se aduce acul în poziția inițială, apoi se orientează spre partea posterioară a corpului, introducîndu-l în canalul vertebral și distrugînd măduva spinării prin mișcări de du-te-vino.

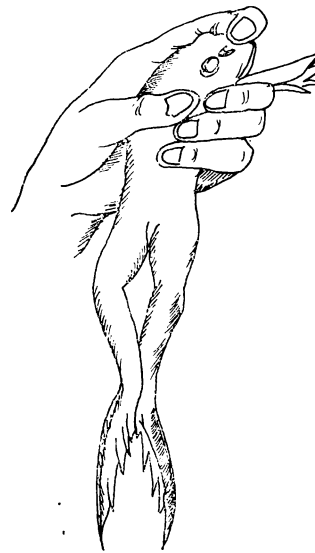


Fig. 229. Imobilizarea broaştei.

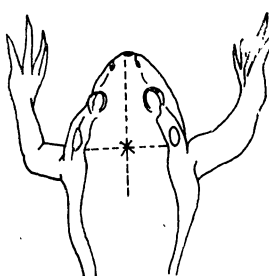


Fig. 230 a. Principalele repere anatomice în vederea distrugerii axului cerebro-spinal.

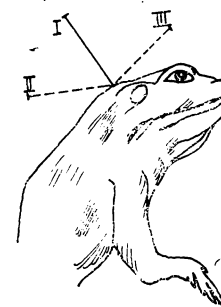


Fig. 230 b. Poziţia acului cu gămălie în diverse momente ale paralizării broaştei.

Animalul paralizat, avînd membrele puternic extinse, este așezat, cu spatele în sus, pe o planșă de plută, după care, cu ajutorul unor ace cu gămălie, i se fixează membrele, cu excepția membrului posterior de la care intenționăm să obținem preparatul. Cu ajutorul foarfecelui, se îndepărtează tegumentul care acoperă tendonul lui Ahile, iar cu o baghetă de sticlă, se disociază tendonul de pe os. După ce trecem un fir de ață pe sub tendon, acesta se leagă strîns și apoi se secționează înapoia ligaturii. Urmează disocierea tendonului și a mușchiului gastrocnemian pînă în apropierea genunchiului.

Îndepărtăm tegumentul din regiunea coapsei, iar apoi cu bagheta de sticlă, disociem longitudinal masa musculară a acesteia pînă cînd apare nervul sciatic. Acesta este ușor de recunoscut după culoarea sa albă-sidefie, fiind însoțit de vena sciatică (Fig. 231). Ferind nervul sciatic

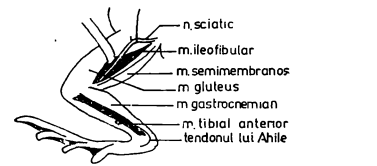


Fig. 231. Topografia nervului sciatic și a mușchiului gastrocnemian.

de eventualele leziuni, se trece la secționarea coapsei deasupra genunchiului. Apoi se îndepărtează vasul de sînge și se izolează nervul pe toată lungimea coapsei, secționîndu-l cît mai aproape de coccis. Preparatul se detașează de pe substratul osos, odată cu secționarea osului tibial, sub genunchi.

Preparatul astfel obținut îl așezăm pe o lamă de sticlă și îl acoperim cu un tampon de vată îmbibat în ser fiziologic.

2. Punerea în evidență a contracțiilor musculare.

Contractilitatea este proprietatea mușchilor de a se scurta sau de a dezvolta o tensiune la capetele lor, atunci cînd sînt excitați direct sau indirect (prin intermediul nervului corespunzător).

După particularitățile lor, contracțiile musculare se împart în două categorii : A) contracții simple (secuse) ; B) contracții susținute (tetanusuri și tonusuri).

A. *Secusa.* Este contracția izolată a unui mușchi, consecutivă aplicării unui singur stimul electric (curent continuu).

Materialele necesare. Instrumente de disecție, dispozitiv de excitare (Fig. 232) și preparate biologice (preparatul neuro-muscular sciatic-gastrocnemian și un segment din stomac).

Modul de lucru: a. Secusa mușchiului striat. Capătul mușchiului, situat în vecinătatea articulației genunchiului, se fixează la suportul de lemn al instalației, cu ajutorul unui ac cu gămălie. Prin intermediul firului de ață punem tendonul lui Ahile în legătură cu brațul scurt al pîrghiei înscriitoare. La capătul brațului lung al acesteia, fixăm un steguleț. Apoi așezăm nervul sciatic peste capetele nude (lipsite de înveli-

șul izolant) ale firelor conducătoare, incluse în dispozitivul de excitare, și acoperim cu un mic tampon de vată, îmbibată cu ser fiziologic.

Este necesar ca, după montarea preparatului, pîrghia înscriitoare să aibă o poziție orizontală. Procedăm apoi la excitarea unică a preparatului, prin apăsarea pe întrerupătorul de sonerie. Se va observa o mișcare rapidă, pe verticală, a pîrghiei cu steguleț colorat, fapt ce demonstrează contracția izolată a mușchiului gastrocnemian, consecutivă excitării indirecte a acestuia.

b) Secusa mușchiului neted. Pentru obținerea preparatului, se procedează în felul următor. După ce paralizăm broasca, o așezăm pe spate, pe plăcuța de plută, și o fixăm cu ace. Apoi secționăm tegumentul și musculatura abdominală pe linia mediană a corpului. Pătrunzînd astfel în cavitatea abdominală, evidențiem stomacul, din care se detașează un segment din regiunea mijlocie. Prin lumenul segmentului trecem două fire de ață, care se ligaturează la o mică distanță între ele. În continuare secționăm segmentul gastric între cele două noduri, obținînd astfel un preparat de formă dreptunghiulară (Fig. 233).

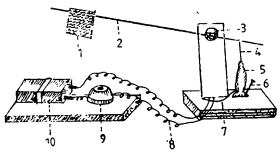


Fig. 232. Instalație pentru înregistrarea contracțiilor musculare și dispozitivul pentru excitarea electrică. 1 — steag ; 2 — pai de grîu ; 3 — rolă de lemn ; 4 — fir de ață ; 5 — mușchi gastrocnemian ; 6 — ac de gămălie ; 7 — nervul sciatic ; 8 — conductori ; 9 — buton de sonerie ; 10 — baterie de lanternă.

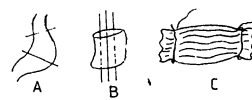


Fig. 233. Prepararea stomacului de broască pentru înregistrarea secusei mușchiului neted. A — segment stomacal ; B — secțiunea longitudinală a inelului stomacal ; C — desfacerea inelului stomacal în urma ligaturării cu două fire de ață

Preparatul astfel obținut îl montăm la instalația reprezentată în fig. 232. În acest scop fixăm un fir de ață pe plăcuța suportului, iar celălalt (mai lung) îl legăm de penița înscriitoare.

Excitarea se realizează prin atingerea preparatului cu cele două sîrme ale dispozitivului de excitare. Prin aceasta se obține o contracție mai lentă și de mai lungă durată decît aceea a mușchiului striat.

B. *Contracții susținute.* a) Tetanosul este contracția musculară prelungită care se obține prin aplicarea mai multor excitații, la intervale de timp mai scurte decît durata efectuării unei secuse (15—30 excitații pe secundă).

Pentru obținerea tetanosului, se utilizează aceleași materiale și aceleași procedeu ca și pentru obținerea secusei. Deosebirea constă numai în modul de administrare a excitantului electric, în sensul că acesta nu

se aplică o singură dată (ca în cazul secusei), ci sub forma unor salve (succesiuni de stimuli). Ca urmare a acestui fapt, penița înscriitoare (cu steagul colorat) se va menține mai mult timp la un nivel ridicat.

Notăm că, în organism, mușchii scheletici efectuează numai contracții susținute, deoarece ei sînt excitați de impulsuri nervoase care se propagă sub formă de salve.

b) Tonusul muscular reprezintă acea stare de încordare susținută a mușchilor, care nu se manifestă sub formă de mișcări.

Prin modularea tonusului diferitelor grupe de mușchi se realizează diferite posturi ale corpului.

Dacă tăiem nervul unui mușchi, tonusul său dispare imediat. Acest fenomen poate fi demonstrat foarte ușor la o broască. Luăm o broască și o anesteziem cu eter sau cu cloroform, după care trecem la evidențierea și secționarea nervului sciatic, cît mai aproape de originea lui. După această operație broasca este atîrnată de un stativ, cu ajutorul unui cîrlig, ce trece prin mandibulă.

După dispariția efectului anestezic, se constată că piciorul denervat devine flasc și pare mai lungă decît piciorul cu nervul intact (Fig. 234). Astfel, se demonstrează că musculatura striată a membrelor pos-

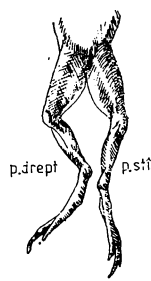


Fig. 234. Relaxarea mușchilor membrului posterior stîng după secționarea nervului sciatic.

terioare se află într-o ușoară stare de încordare, indusă de centrii nervoși din axul cerebrospinal.

3. Punerea în evidență a curenților bioelectrici (curentul de repaus și curentul de acțiune). Curentul de repaus reprezintă diferența de potențial electric care se stabilește între suprafața integră a mușchiului sau nervului (electropozitivă) și suprafața secțiunii transversale (electronegativă).

Curentul de acțiune se definește ca fiind variația de potențial electric ce apare între regiunea excitată (electronegativă) a mușchiului sau nervului și regiunile învecinate (electropozitive).

Materialele necesare. Două preparate neuro-musculare (sciatic-gastrocneamian de broască), lame și baghete de sticlă, acumulatori sau ba-

terie de lanternă (2—4 V), întrerupător de sonerie, sîrme izolate, vată, ser fizologic, plăcuțe de plută și instrumentar de disecție.

Modul de lucru. a. Punerea în evidență a curentului de repaus din mușchi prin experiența cu laba galvanoscopică. În vederea realizării acestei experiențe este necesară pregătirea a două preparate neuro-musculare, pe care le punem pe cîte o lamă de sticlă. Unul din preparate (A) este complet denudat și detașat de pe os, iar mușchiul său este secționat transversal (aproximativ la jumătatea lui).

Cel de-al doilea preparat (B) reprezintă în fapt „laba galvanoscopică", cu nervul sciatic cît mai lung. Cu ajutorul unei baghete de sticlă aducem o porțiune a nervului preparatului B în contact cu suprafața secțiunii transversale a mușchiului preparatului A, iar cu ajutorul altei baghete capătul aceluiași nerv este lăsat să cadă pe suprafața longitudinală a aceluiași mușchi (Fig. 235). În acest moment, se produce o contracție a labei galvanoscopice.

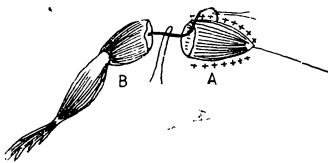


Fig. 235 a. Punerea în evidență a fenomenelor bioelectrice din mușchi : A — mușchi secționat transversal ; B — laba galvanoscopică.

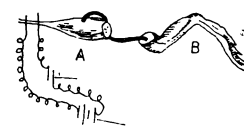


Fig. 235 b. Punerea în evidență a curentului de acțiune : 1 — sursă de curent ; 2 — întrerupător.

Mușchiul secționat constituie sursa de potențial de repaus, iar nervul, conductorul care închide circuitul între cele două suprafețe. La închiderea circuitului, potențialul de repaus produce excitarea nervului, contracția mușchiului.

b) Punerea în evidență a curentului de acțiune. Lăsăm în contact permanent suprafața întreagă a mușchiului preparatului A cu nervul sciatic al preparatului B. Apoi excităm cu curent electric continuu nervul sciatic al preparatului A și observăm că, la fiecare contracție a mușchiului corespunzător, se produce și o contracție a labei de broască. Contracția din urmă se datorește curentului de acțiune care a luat naștere în preparatul A și care s-a propagat și în preparatul B.

4. Legile reflexelor medulare (legile lui Pflüger). Impulsurile nervoase, care se propagă prin centrii nervoși, depind de intensitatea excitațiilor care le provoacă. Astfel, excitațiile slabe dau naștere la impulsuri care nu pot străbate decît un mic număr de sinapse, pe cînd cele puternice pot să se răspîndească la un foarte mare număr de neuroni.

Materialele necesare. Broască, instrumente de disecție, suport cu tijă, cîrlig de sîrmă, soluție de acid acetic 10%, pahar Berzelius, vată și ser fiziologic.

Modul de lucru. Decapităm o broască, secționîndu-i axul cerebro-spinal la limita dintre bulb și măduva spinării (Fig. 236) și o atîrnăm

Fig. 236. Decapitarea broaștei.

de un suport prin intermediul unui cîrlig trecut prin mandibulă (Fig. 237). Așteptăm 5'—10', pentru a dispare șocul spinal, după care trecem la efectuarea experienței, procedîndu-se în felul următor. Punem soluția

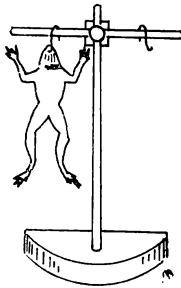


Fig. 237 b. Demonstrarea legilor lui Pflüger: a — „broasca decapitată"; b — vasul cu acid acetic; 1 — legea localizării; 2 — legea unilateralității; 3 — legea simetrie; 4 — legea iradierii; 5 — legea generalizării.

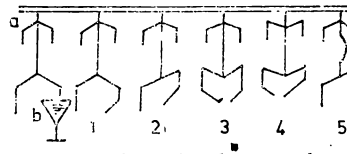


Fig. 237 a. Broască spinală pregătită pentru studiul reflexelor medulare.

de acid acetic (eventual oțet) într-un pahar și introducem un deget al unui membru posterior în soluție. Așteptăm puțin și observăm că animalul își retrage încet piciorul, scoțînd degetul din soluție. Prin aceasta se demonstrează legea localizării reflexelor.

Apoi introducem în soluția acidă, porțiuni din ce în ce mai mari ale labei broaștei spinale, avînd grijă ca după fiecare probă să spălăm cu apă regiunea excitată; observăm răspunsuri din ce în ce mai complexe: retragerea mebrului posterior excitat (legea unilateralității reflexelor), retragerea simultană a ambelor membre posterioare (legea simetriei), contracția tuturor celor patru membre (legea iradierii) și contracții ale musculaturii întregului corp (legea generalizării).

După efctuarea probelor de mai sus aplicăm în regiunea dorsală stîngă, o mică bucată de hîrtie de filtru, îmbibată cu acid acetic glacial. Animalul execută mai întîi mișcări generalizate, după care, prin mișcări precise ale membrului posterior stîng, caută să îndepărteze hîrtia cu acid acetic ceea ce îi reușește după cîteva încercări. Această experiență arată că în cazul unui excitant nociv, reflexele animalului sînt coordonate.

5. Efectele leziunilor la diferite nivcluri ale axului cerebrospinal. Leziunile de la nivelul axului cerebrospinal determină tulburări somatice și vegetative dependente de segmentul nervos afectat.

a) Efectele lezării măduvei spinării între vertebra a 3-a și a 4-a. Luăm o broască și ținînd-o în mîna stîngă (în aceiași poziție ca atunci cînd vrem să o paralizăm), se identifică, cu gămălia unui ac, spațiul intervertebral 3—4. Aici introducem vîrful acului, fără ca aceasta să străpungă planșeul canalului vertebral, apoi i se imprimă mișcări de lateralitate, astfel încît să se obțină o secționare sigură a măduvei spinării.

Consecutiv acestei secționări, se constată pierderea reflexului de redresare, paralizia membrelor inferioare și acumularea de urină în vezică (dacă animalul este menținut în viață 3—4 zile).

b) Efectele lezării bulbului. Leziunile bulbare determină suprimarea reflexelor necondiționate care se închid la acest nivel.

Introducem acul la nivelul articulației cranio-vertebrale și, prin mișcări circulare, se distruge bulbul. Așezăm animalul cu partea ventrală în sus și observăm că acesta este incapabil de a se redresa. De asemenea, se constată dispariția mișcărilor respiratorii ritmice, ale planșeului bucal.

c) Efectele lezării cerebelului. Introducem acul în cutia craniană, lateral de linia mediană a capului, în dreptul membranelor timpanale. Deplasăm apoi lateral spre dreapta sau spre stînga, distrugînd cerebelul din partea respectivă. Scoatem acul și lăsăm animalul liber pe masă. Observăm că broasca adoptă o poziție deosebită față de cea normală și anume axa corpului este deviată spre dreapta sau spre stînga, ca urmare a dispariției tonusului musculaturii somatici de pe una din părțile corpului (Fig. 238).

Dacă se procedează la o stimulare a animalului (ciupire cu pensa), aceasta se deplasează în manej.

10.2. EXPERIENȚA ÎN LEGĂTURĂ CU FIZIOLOGIA ORGANELOR DE SIMȚ

1. Determinarea cîmpului vizual. Cîmpul vizual reprezintă spațiul pe care îl poate percepe ochiul, atunci cînd are o poziție fixă, toate punctele din acest spațiu fiind vizibile în același timp.

Modul de lucru. Se desenează pe tablă roza vînturilor, avînd grijă ca centrul de întretăiere a liniilor să fie la nivelul pupilei persoanei cercetate. Subiectul trebuie să se afle la o distanță de 10—15 cm față de tablă și să privească, cu un singur ochi, cîmpul de întretăiere a liniilor, în timp ce celălalt ochi este închis.

Experimentatorul deplasează o cretă albă, pe direcția fiecărei linii trasate pe tablă, începînd de la periferie spre centru. Cînd subiectul declară că a perceput culoarea albă, oprim deplasarea cretei și marcăm punctul respectiv.

În final punctele se unesc, obținîndu-se astfel un poligon, care reprezintă cîmpul vizual al ochiului respectiv (Fig. 239).

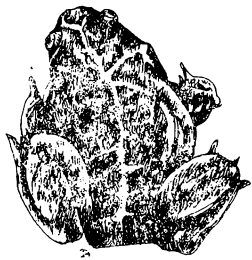


Fig. 238. Efectul lezării unilaterale (partea stîngă) a cerebelului la broască.

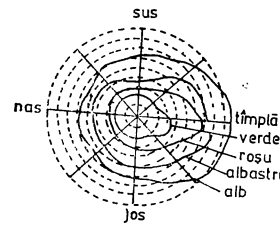


Fig. 239. Demonstrarea cîmpului vizual al ochiului sting pentru alb și diferite culori.

Folosindu-se crete colorate și procedîndu-se în același fel, se pot determina cîmpurile vizuale pentru diferite culori. Acestea sînt mai mici decît cîmpul vizual pentru lumina albă, care este cel mai întins. De asemenea, se mai constată că limitele cîmpului vizual sînt mai largi spre partea externă și inferioară a ochiului și mai reduse spre partea nazală și frontală.

2. *Reflexul pupilar.* Reflexul pupilar este un reflex de acomodare (fotomotor) al ochiului la intensitatea de lumină. Cantitatea de lumină, care pătrunde în ochi, este reglată în mod reflex, cu ajutorul mușchilor radiari și circulari ai irisului. Cînd fibrele musculare radiare se contractă, cele circulare se relaxează, spațiul pupilar crește, fenomen denumit *midriază*, și cantitatea de lumină ce pătrunde în ochi este mai mare. Cînd fibrele musculare circulare se contractă, cele radiare se relaxează, spațiul pupilar se micșorează, fenomen denumit *mioză*.

Midriaza și mioza sînt reflexe fotomotorii coordonate de sistemul nervos vegetativ.

Modul de lucru. Se așează un elev în fața unei surse de lumină artificiale sau naturale și este rugat să privească în depărtare. Experi-

mentatorul îi acoperă cu mîna ambii ochi, timp de 2—3 minute, după care o ridică brusc, observînd în acelaşi timp pupilele subiectului. Va remarca o micşorare bilaterală a diametrului pupilar (mioză).

Reacţia inversă, dilatarea pupilei are loc la întuneric.

De reţinut că variaţiile diametrului pupilar sînt dependente nu numai de factorul lumină, putînd avea şi un determinism mai complex. Astfel, starea de somnolenţă sau somn se caracterizează prin mioză, în timp ce stările vigile, alerte (frică, furie etc.) sînt acompaniate de midriază.

Rolul componentelor nervoase vegetative în reglarea reflexului pupilar poate fi pus în evidenţă pe ochi de broască izolaţi (enucleaţi), utilizînd mediatori chimici.

Pentru a demonstra acest lucru, se procedează în felul următor: se pregătesc 3 cristalizatoare (sticle de ceas) mici, în care se adaugă următoarele soluţii: în primul (martor) ser fiziologic, în al doilea soluţie de adrenalină (în ser fiziologic) 1/10.000 şi în al treilea pilocarpină 2%.

Se pregătesc apoi 6 ochi enucleaţi de la 3 broaşte paralizate (disecţia se face cu grijă pentru a nu leza ochii).

După circa 20—30 minute de ţinere a ochilor în soluţiile corespunzătoare, se compară diametrele pupilare ale ochilor. Se constată că, în comparaţie cu ochii martor, ochii ţinuţi în soluţie de adrenalină prezintă fenomenul de midriază, iar cei plasaţi în soluţie de pilocarpină, fenomenul de mioză.

Andrenalina are acţiune simpaticomimetică, iar pilocarpina acţiune parasimpaticomimetică.

3. *Rolul pavilionului urechii în audiţie.* Pavilionul urechii, prin forma şi prin cutele sale are rolul de captare şi dirijare a sunetelor spre conductul auditiv extern.

Materialul necesar. Tub de cauciuc cu diametrul de 0,8—1 cm şi lungimea de 2 m, un metronom sau ceasornic de masă, un tub de sticlă în formă de Y.

Modul de lucru. Se foloseşte un sistem de 3 tuburi de cauciuc; două dintre ele, avînd fiecare lungimea de 0,5 m, sînt interconectate prin tubul de sticlă Y, cu un tub mai lung de 1,5 m.

Se introduc ambele capete ale tubului în cele două conducte auditive externe ale unui elev. Prin aceasta se suprimă funcţional ambele pavilioane. La extremitatea liberă a tubului lung se plasează un metronom sau ceasornic care să funcţioneze. Experimentatorul invită pe elev să ţină ochii închişi, în timp ce el însuşi ţine tubul Y în înapoia elevului, într-o poziţie fixă. Un alt elev deplasează tubul lung şi împreună cu el sursa sonoră, în diferite poziţii în raport cu capul elevului investigat (deasupra, lateral, în spate, mai sus, mai jos). Se constată că elevul percepe de fiecare dată sunetele emise de metronom, dar este incapabil să precizeze direcţia din care acestea vin.

Contraproba se poate face prin îndepărtarea sistemului de tuburi şi manipularea metronomului singur. În noile condiţii, cînd pavilioanele urechilor redevin funcţionale, elevul va fi capabil nu numai să audă, dar şi să precizeze direcţia din care vin sunetele.

4. *Sensibilitatea gustativă.* Senzațiile gustative primare de dulce, acru, sărat și amar sînt determinate de impulsuri nervoase formate la nivelul receptorilor gustativi de pe mucoasa bucală, lingvală, faringe și epiglotă.

Cele 4 senzații gustative nu se produc cu aceeași intensitate prin excitarea repectorilor, excitînd receptori specializați și distribuiți topografic pentru fiecare din gusturi.

Materialul necesar. Sticluțe mici cu diferite soluții sapide în concentrații convenabile : sărat (sare de bucătărie), dulce (zahăr), acru (oțet) și amar (chinină sau sare amară), tampoane mici de vată, pensă anatomică.

Modul de lucru. Subiectul (elevul), în poziție șezîndă, ține ochii închiși și limba scoasă afară. Cu ajutorul pensei, experimentatorul ia mici tampoane de vată îmbibate cu o anumită soluție sapidă și atinge cu ele limba elevului în diferitele sale regiuni. După fiecare încercare, se clătește bine gura cu apă. Se procedează la fel cu fiecare dintre cele 4 soluții. Pe un desen, reprezentînd forma limbi, se notează locurile în care elevul a avut senzații sapide nete. Se obține o hartă a ariilor pentru diferitele sensibilități gustative (fig. 240).

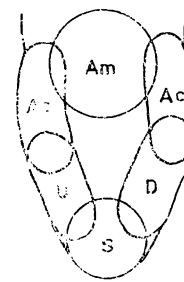


Fig. 240. Ariile gustative : S — sărat ; D — dulce : Ac — acru ; Am — amar.

Se constată că sensibiltatee pentru sărat este localizată către vîrful limbii, pentru dulce în zonele lateralo-anterioare, pentru acru în zonele lateralo-posterioare, iar pentru amar la baza limbii, corespunzător localizării diverșilor receptori gustativi. Se mai remarcă și faptul că, între diferitele arii gustative există bogate zone de interferență.

5. *Sensibilitatea termică.* Sensibilitatea termică include sensibilitatea la cald și la rece. Receptorii specializați sînt terminații nervoase libere și corpusculii Ruffini pentru cald și ai lui Krause pentru rece. Ei sînt situați în tegument și mucoase (nazală, bucală, laringiană, etc.). Vorbim de senzația de cald sau rece cînd tegumentul vine în contact cu un corp a cărui temperatură este mai ridicată sau mai scăzută decît temperatura proprie. Sensibilitatea termică este relativă, în sensul că depinde și de temperatura prealabilă a mediului.

Teritoriile tegumentare mai sensibile la cald și rece sînt cele ale obrajilor, dosului mîinilor, care sînt mai sensibile la variațiile de temperatură decît fețele palmelor, degetelor. Această diferență de acuitate termică se explică prin densitatea mai mare sau mai mică a receptiorilor termici.

Materialul necesar. 3 vase cu apă la temperaturi diferite, termometru de laborator.

Modul de lucru. Se pregătesc trei vase cu apă la temperaturi diferite : 15°, 30° și 45°. Introducem mîna dreaptă la 45°, iar mîna stîngă la 15°. Deși este vorba de o aceeași temperatură, la mîna dreaptă (care în prealabil a fost încălzită), vom avea senzația de rece, iar la mîna stîngă, în prealabil răcită, senzația de cald.

Din această experiență rezultă că capacitatea de diferențiere a intensității excitațiilor termice este mică și dependentă de temperatura regiunii cutanate asupra căreia acționează excitanții termici, putînd fi apreciată numai în mod compartiv de „mai cald" sau „mai rece", deci calitativ și nu cantitativ.

De fapt relativitatea simțului termic este cunoscută și din fapte cotidiene. De pildă, dacă intrăm într-o pivniță, vara, veniți din canicula de afară, vom avea senzația de răcoare, iar dacă intrăm iarna, senzația de cald.

10.3. FIZIOLOGIA DIGESTIEI

1. *Acțiunea hidrolizantă a salivei.* În compoziția chimică a salivei umane se găsesc două enzime glicolitice : amilaza (ptialina) care hidrolizează amidonul din alimentte pînă la stadiul de maltoză și maltaza care scindează maltoza în două molecule de glucoză. Pe parcursul hidrolizei, de la amidon la maltoză, apar produși intermediari, denumiți dextrine, care dau colorații carcteristice cu iodul. Astfel, în prezența iodului, amidonul se colorează în albastru, amilodextrina în violet, eritrodextrina în roșu și acrodextrina în gălbui. Maltoza și glucoza nu se colorează cu iodul, soluțiile respective rămînînd incolore. Glucoza poate fi pusă în evidență prin reacția Fehling.

Enzimele salivare au o activitate optimă la un pH neutru și la temperatura de 38°C. Ele sînt distruse prin fierbere și inactivate (reversibil) la temperatura de 0°C.

Materialul necesar. Stativ pentru eprubete, pipete, vată de sticlă sau hîrtie de filtru, pîlnie de sticlă, baie de apă, gheață, termometru, bec flacără, sticlă picătoare, pahar sticlă, soluție de amidon 5‰, soluție iodo-iodurată, licoare Fehling, HCl 20‰, salivă.

Prepararea soluțiilor

1) *Soluția de amidon* 5‰. La 1 litru de apă distilată se adaugă 5 g amidon ; se fierbe 10 minute, după care se răcește.

2) *Soluția iodo-iodurată.* În 30 ml apă distilată se dizolvă 2,54 iod și 4 g KI, după care se completează pînă la 1000 ml cu apă distilată.

3) *Licoarea Fehling.* Se prepară separat soluția I și soluția II. Soluția I conține SO_4Cu 40%. Soluția II este un amestec de 200 g sare Seignette și 150 g NaOH, adaus la 1000 ml cu apă distilată. Fehling I și

Fehling II se păstrează separat și se amestecă în proporții egale înainte de utilizare.

4) *HCl 20‰*. 20 ml HCl concentrat se aduc la 1 l cu apă distilată.

Modul de lucru

Proba I. Se colectează saliva, care se filtrează prin hîrtie de filtru sau prin vată de sticlă. Se pregătesc 4 eprubete cu următoarele soluții :

a) 2 ml soluție amidon 5‰ + o picătură soluție iodo-iodurată

b) 2 ml soluție amidon 5‰ + 0,5 ml salivă + o picătură soluție iodo-iodurată.

c) 2 ml soluție amidon 5‰ + 0,5 ml salivă fiartă și apoi răcită + o picătură iodo-iodurată.

d) 2 ml soluție amidon 5‰ + 0,5 ml salivă răcită la 0°C + o picătură soluție iodo-iodurată.

Eprubeta *a* conține proba martor, amidonul în prezența iodului colorîndu-se în albastru. În eprubeta *b*, enzimele salivare hidrolizează amidonul pînă la stadiul de glucoză, soluția devenind incoloră. În eprubeta *c*, enzimele au fost distruse prin fierbere, soluția rămîne colorată în albastru, indicînd prezența amidonului nehidrolizat. În fine, în eprubeta *d*, enzimele au fost inactivate reversibil prin răcire la 0°C, iar soluția inițial colorată în albastru, se va decolora progresiv, devenind incoloră (o dată cu creșterea temperaturii în cameră).

Proba II. Cu soluția din eprubeta *b* sau *d* se face reacția Fehling. La soluția de probă se adaugă un volum egal de licoare Fehling, după care eprubeta este încălzită la flacăra unui bec Bunzen.

La cald, glucoza reduce $CuSO_4$ în CuO care se prezintă sub forma unui precipitat de culoare roșie-cărămiziu. Este o reacție caracteristică de evidențiere a glucozei în soluție.

Proba III. Într-un pahar se introduc 30 ml soluție amidon 5‰ + 10 ml HCl 20‰. Se fierbe la flacăra unui bec. Din 3 în 3 minute, se iau mici eșantioane din proba care fierbe, adăugîndu-se cîte o picătură de soluție iodo-iodurată. Se obține o gamă de culori, etalate de la albastru (amidon) la incolor (maltoză și glucoză) și trecînd prin fazele intermediare corespunzătoare dextrinelor.

10.4. SÎNGELE

1. *Determinarea grupelor sanguine.* Pe membrana hematiilor există antigeni, numiți aglutinogeni, iar în plasma sanguină se găsesc anticorpi, numiți aglutinine.

Aglutinogenii au fost notați cu A și B iar aglutininele cu α și β. Lipsa unuia sau altuia din factori este notat cu 0.

Cunoașterea grupelor sanguine este necesară în cazul transfuziilor de sînge cînd se pot întîmpla accidente grave dacă nu se respectă anumite reguli. Astfel, în transfuziile obișnuite trebuie evitată întîlnirea *antigenilor donatorului cu anticorpii corespuzători ai primitorului* — de exemplu —, nu se pot introduce într-un sînge care are anticorp α, sînge cu antigen A etc.

Reacțiile antigen-anticorp care s-ar produce într-o asemenea împrejurare, de tipul aglutinării și al lezării hematiilor donatorului ar perturba grav circulația și ar duce la importante fenomene toxice.

Materialul necesar. Ser hemotest, lame de sticlă, vată, alcool, ac stetrilizat (flambat la flacără), pipete, baghete de sticlă. Serurile hemotest se procură de la centrele județene de recoltare și conservare a sîngelui. În sticluțe etichetate există :

— serul hemotest I (0) — care conține aglutininele α, β
— serul hemotest II (A) — care conține aglutinina β
— serul hemotest III (B) — care conține aglutinina α

Modul de lucru. Pe o lamă de sticlă degresată cu alcool se pune succesiv, folosind pipete deosebite, cîte o picătură de hemotest, în ordinea 0—A—B. (Hemotestul este echivalent cu sîngele primitorului).

Se șterge pulpa unui deget (al 4-lea) cu alcool și se înțeapă cu acul de siringă flambat. Primă picătură de sînge se îndepărtează. Lîngă picăturile de hemotest se adaugă cîte o picătură de sînge (mărimea picăturii de sînge trebuie să fie 1/20 din picătura de hemotest (Fig. 241). Cu ajutorul unei baghete de sticlă, fiecare picătură de sînge se amestecă cu picătura de ser hemotest apropiată și se așteaptă 2—3 minute.

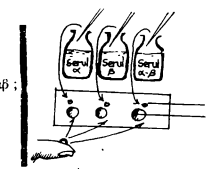


Fig. 241. Hemotest cu seruri avînd aglutinine α, β, αβ ; 1 — hemotest ; 2 — sînge.

Se pune lama pe un fond alb, și se observă reacțiile de aglutinare. Dacă aglutinarea este absentă în cele 3 picături, sîngele aparține grupei I (0) ; dacă dimpotrivă, aglutinarea s-a produs în toate cele 3 picături, sîngele aparține grupei IV (AB).

Dacă aglutinarea s-a produs în serul hemotest 0 și A, sîngele face parte din grupa III (B), iar dacă aglutinarea a avut loc în serul 0 și B, sîngele va aparține grupei II (A) (Fig. 242).

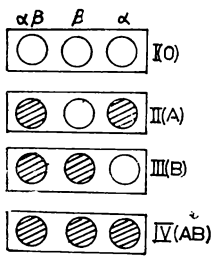


Fig. 242. Modul de identificare a grupelor sanguine.

Pe baza rezultatelor obținute se poate constitui schema compatibilității transfuziilor de sînge (Fig. 243).

10.5. FIZIOLOGIA CIRCULAȚIEI

1. *Observarea activității contractile a inimii de broască.* Inima este organul propulsor al sîngelui. Activitatea sa se desfășoară ritmic și automat, datorită prezenței în structura sa a țesutului muscular embrionar, cu proprietăți excito-conducătoare, și a ganglionilor nervoși.

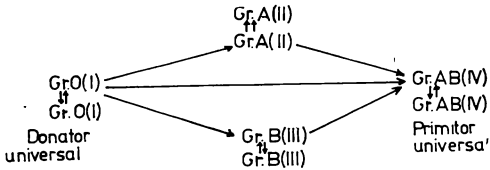


Fig. 243. Schema compatibilității grupelor sanguine.

Contracțiile inimii pot fi observate, atît pe inima aflată în organism, cît și pe inima izolată.

Materialul necesar. Instalație pentru evidențierea contracțiilor, broască de lac, instrumente de disecție, cîrlig de sîrmă (serfină), ață, ace.

Modul de lucru. Se paralizează o broască și se fixează pe o plăcuță de plută (sau vas cu ceară) cu partea ventrală în sus. Se face o incizie a tegumentului pe linia mediană, în regiunea toracică, după care se apucă cu pensa vîrful plastronului sternal, pătrunzînd cu foarfecele în cavitatea toracică. Se secționează de o parte și de alta claviculele, cu evitarea arterelor brahiale. Cu o pensă se apucă membrana pericardică și se secționează, degajînd inima.

Elevii pot observa deja bătăile inimii în sacul pericardic.

Pentru ca activitatea cardiacă să poată fi observată de la distanță și de toți elevii, broasca este plasată pe instalația folosită la contracțiile musculare. Se prinde vîrful ventriculului cu un cîrlig de sîrmă (serfină) prevăzut cu un fir de ață, care se anexează în brațul scurt al pîrghiei înscriitoare. Pîrghia cu steguleț începe să reproducă mișcările ritmice ale inimii (Fig. 244).

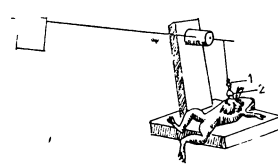


Fig. 244. Instalație pentru demonstrarea contracțiilor inimii de broască: 1 — cîrlig de sîrmă; 2 — inimă.

Privind de aproape, se observă că mai întîi se contractă atriile și apoi ventriculul, precum și faptul că în timpul contracției inima este mai deschisă la culoare decît în timpul relaxării. De asemenea, pot fi făcute observații și asupra sinusului venos, care prezintă proprietăți contractile. Astfel, dacă punem pe acesta un tampon de vată îmbibat în ser fiziologic rece, ritmul contracțiilor cardiace scade, iar dacă serul este cald, ritmul se accelerează.

2. *Observații asupra automatismului cardiac — Legăturile lui Stannius.* În masa țesutului muscular cardiac, în anumite regiuni ale acestuia, la broască, se află aglomerări de celule nervoase ganglionare în complex cu celule musculare din cadrul țesutului excitoconducător. Aceste formațiuni neuro-musculare intervin prin procese caracteristice excitatorii și inhibitorii în desfășurarea activității cardiace.

Rolul principal în automatismul inimii de broască îl deține nodul sinusal situat în peretii sinusului venos și cunoscut sub numele de *ganglionul Remak.* Un alt nodul este cel atrioventricular sau *ganglionul lui Bidder,* activator secundar al inimii de broască.

În peretele interatrial se găsește un al treilea ganglion, *ganglionul Ludwig,* care nu posedă automatism, ci joacă un rol moderator asupra frecvenței și forței contracțiilor cardiace.

Experimetul, ce poate demonstra rolul diferiților noduli, este cunoscut sub numele de *„ligaturile lui Stannius"* și urmărește efectele izolării prin ligaturare a nodulilor respectivi, activitatea automată a inimii.

Material necesar. Instalație pentru demonstrarea contracțiilor inimii izolate, canulă de sticlă, cîrlig de sîrmă, pahare, soluție fiziologică, broască.

Modul de lucru. Broasca paralizată este fixată pe planșetă. Se pune în evidență inima și fără a face hemoragie, se secționează pericardul și se îndepărtează. Se trece un fir de ață pe sub crosele aortice și apoi se răstoarnă vîrful inimii pentru a se putea observa bine locul de unire a sinusului venos cu atriile, marcat printr-o linie albă. Se aduc capetele firului deasupra sinusului venos și se face un nod ferm prin care se izolează sinusul de atrii. (Nodul trebuie să fie plasat spre regiunea atrială ; linia albă rămînînd în afara nodului, spre sinus).

Se constată că după această ligatură, atriile și ventriculul se opresc, în timp ce sinusul continuă să se contracte în ritm normal, ritm pe care îl putem cronometra.

Izolarea ganglionului Remak (prima ligatură) face ca impulsul motor inițiat în el să nu mai ajungă la inimă. Ca atare, inima rămîne sub influența predominantă a ganglionului inhibitor Ludwig și se oprește în relaxare.

La aceeași inimă se aplică o a doua ligatură (menținîndu-se cea dintîi) pe șanțul dintre atrii și ventricul. Se constată că ventriculul își reia activitatea ritmică dar cu o frecvență mai scăzută decît a sinusului. Aceasta se datorește izolării ventriculului de ganglionul nervos Ludwig, cu rol inhibitor, și de asemenea, impulsurilor generate în nodul atrio-ventricular (cu rol secundar în automatism).

La o altă inimă la care se aplică o ligatură numai pe șanțul atrio-ventricular, pentru scurt timp inima se oprește, apoi își reia contrac-

țiile și pot fi deosebite două ritmuri : unul sinoatrial cu frecvență mai mare și altul, cu mult mai rar, al ventriculului. În acest caz se izolează regiunea sinoatrială de cea ventriculară și fiecare din aceste regiuni se află sub acțiunea stimulatoare a unui ganglion, însă cu cadențe diferite, ceea ce explică și diferența de frecvență a contracțiilor. Este cea de a III-a ligatură Stannius (Fig. 245).

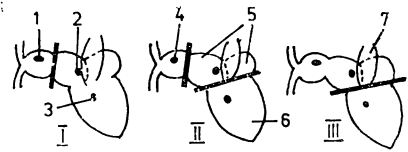


Fig. 245. Ligaturile lui Stannius. 1 — ganglionul Remak ; 2 — ganglionul Ludwig ; 3 — ganglionul Bidder ; 4 — sinusul venos ; 5 — atrii ; 6 — ventricul ; 7 — bulb aortic.
I — prima ligatură ; II — a doua ligatură ; III — a treia ligatură.

3. *Observarea la microscop a circulației în capilare.* Circulația în rețeaua capilară poate fi ușor observată la microscop pe preparate de mezenter, țesut pulmonar, membrană interdigitală și limbă de broască.

Materialul necesar. Broaște, instrumente de disecție, planșetă, avînd un orificiu cu diametrul de 2 cm, ace cu gămălie, tifon, vată, ser fiziologic, microscop.

Modul de lucru. Pentru observarea circulației sîngelui în capilare, broasca se imobilizează prin legarea pe planșeta de plută cu ajutorul unor fețe de tifon sau prin distrugerea nevraxului și legarea membrelor la planșetă.

Broasca trebuie să fie astfel așezată pe placa de plută, încît organul asupra căreia se vor face observațiile, să poată fie etalat deasupra orificiului circular. Astfel, pentru observarea circulației în capilarele limbii, aceasta se întinde bine deasupra deschiderii circulare și se fixează pe marginile acesteia cu ajutorul acelor cu gămălie. Se umezește limba cu ser fiziologic și se observă la microscop.

Pentru membrana interdigitală se folosește aceeași broască fixată pe planșetă, cu ajutorul unor sfori, în așa fel, încît membrana să se poată întinde deasupra orificiului cu ajutorul unor ace cu gămălie, înfipte în falange. Se umezește membrana cu ser fizologic și se privește la microscop.

În ambele cazuri se poate observa că circulația în capilare este foarte lentă în comparație cu cea din arteriole și venule, iar eritocitele se deplasează una cîte una, din cauza lumenului mic al acestor vase.

În capilarele cu diametru mai mare viteza de circulație a eritocitelor este mai mare pe centru și mai redusă la periferie din cauza frecării acestora de pereții vasului.

10.6. FIZIOLOGIA RESPIRAȚIEI

1. *Rolul diafragmei în respirație. Experiența lui Donders.* Diafragma joacă un rol foarte important în realizarea mișcărilor de inspirație și expirație. Prin aceste mișcări respiratorii se modifică în mod ritmic volumul cavității toracice.

Materialul necesar. Cobai sau iepure, dispozitivul Donders, instrumentar de disecție, cloroform sau eter, vată, tavă sau castron de disecție.

Modul de lucru. Scoaterea plămînilor din cavitatea toracică se face în felul următor : anesteziem bine animalul, după care legăm picioarele de tavă cu ajutorul a patru sfori, cu partea ventrală în sus. Cu ajutorul foarfecelui sau bisturiului facem o tăietură a tegumentului pe linia mediană a corpului, începînd din regiunea pubiană și pînă sub bărbie. Jupuim pielea pe toată partea ventrală și o fixăm cu ajutorul unor ace cu gămălie de o parte și de alta a animalului. După înlăturarea pielii, se observă pe linia medio-ventrală o linie mai alburie, numită „linia albă".

Deschiderea cavității abdominale se face tăindu-se peretele corpului pe direcția liniei albe. Punerea în evidență a organelor din cavitatea toracică se realizează prin secționarea coastelor pe laturile corpului. Apoi ridicăm încet osul stern, cu ajutorul unei pense, și îl îndepărtăm. În acest fel cavitatea toracică devine deschisă și separată de cavitatea abdominală prin mușchiul diafragmic. În imagine apar plămînii — două organe de culoare roz. Prindem cu mîna traheea, iar cu ajutorul unei pense o disociem de țesuturile înconjurătoare ; apoi o tăiem cît mai sus și astfel scoatem plămînii la exterior.

Pregătirea dispozitivului Donders. Desfacem membrana de cauciuc de la partea inferioară a clopotului de sticlă și scoatem tubul metalic central, care străbate dopul de cauciuc din partea superioară a clopotului. După aceea legăm traheea pulmonului de acest tub (Fig. 246).

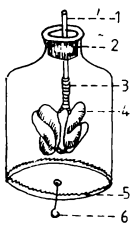


Fig. 246. Dispozitivul Donders : 1 — tub metalic ; 2 — dop de cauciuc ; 3 — trahee ; 4 — plămîni ; 5 — membrană de cauciuc ; 6 — cîrlig.

Acum aplicăm din nou membrana de cauciuc și o legăm bine, prin intermediul unei ațe, de **marginea clopotului de sticlă.**

Trăgînd în jos de cîrligul care este lipit de un disc de aluminiu la membrana de cauciuc, se va face, o depresiune în incinta clopotului. Presiunea atmosferică de la exterior va pătrunde prin trahee în plămîni și îi va dilata. Prin aceasta s-a evidențiat actul analog inspirației.

Apăsînd, prin intermediul aceluiași cîrlig, asupra membranei de cauciuc, presiunea din interiorul clopotului va crește, devenind astfel mai mare decît presiunea atmosferică externă. În această situație, aerul

din plămîni va ieşi afară (prin tubul de cauciuc), şi aceştia se vor micşora. Acesta este actul **analog expiraţiei.**

Variaţiile volumului pulmonar se datoresc deci, în primul rînd, modificărilor de contracţie a diafragmei, în cazul nostru a membranei de cauciuc.

În lipsa plămînilor de iepure sau cobai se poate folosi numai aparatul Donders. Cu ajutorul lui se poate înţelege rolul fiziologic al muşchiului diafragmei cu mecanica respiratorie şi rolul ţesutului elastic pulmonar.

Materialul necesar. Aparatul Donders cu anexele sale. Aparatul Donders se compune dintr-un clopot de sticlă prin a cărui gît trece un dop străbătut de un tub de sticlă ramificat de care se prind două balonaşe de cauciuc (fig. 247). Partea de jos a clopotului este închisă

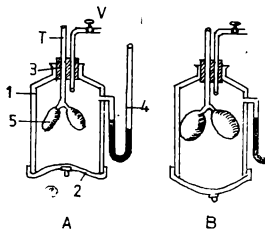


Fig. 247. Experienţa lui Donders : A — epiraţie ; B — inspiraţie ; 1 — clopot de sticlă ; 2 — membrană de cauciuc ; 3 — dop prin care trece tubul (T) corespunzător traheei şi un vid parţial ; 4 — manometru ; 5 — balonaşe de cauciuc conectate la capătul bifurcat al tubului (T).

cu o membrană de cauciuc ce are la mijlocul ei, în afară, un cîrlig de care se poate trage.

Modul de lucru. Trăgînd în jos de membrana de cauciuc, spaţiul în clopot creşte şi se micşorează presiunea : atunci în balonaşe intră aer atmosferic şi el se dilată. Membrana de cauciuc are rolul diafragmei, iar tragerea ei în jos reprezintă contracţia în cursul inspiraţiei, urmată de alungirea diametrului longitudinal.

Dînd drumul membranei de cauciuc, spaţiul din clopot se micşorează, ca urmare acesta revine ; presiunea în cavitatea clopotului şi în balonaşe creşte peste valoarea presiunii atmosferice ; balonaşele sînt comprimate şi aerul intrat în ele este evacuat pînă la egalerea presiunii (Fig. 247). Elevii au observat astfel modificările de volum ale plămînului în timpul celor două faze ale respiraţiei.

Măsurarea capacităţii vitale. Prin capacitate vitală se înţelege volumul de aer pe care îl poate expira o persoană la sfîrşitul unei inspiraţii forţate. El cuprinde următoarele fracţiuni :

1. *Volumul respirator curent* în valoare de 500 ml — reprezintă volumul de aer insiprat şi expirat, în cursul unei respiraţii normale ;

2. *Volumul inspirator de rezervă sau aerul complementar,* în valoare de cca. 1800 ml, reprezintă cantitatea suplimentară de aer introdusă în plămîni după o inspiraţie normală, printr-o inspiraţie forţată ;

3. *Volumul expirator de rezervă*, în valoare de cca. 1500 ml, reprezintă cantitatea de aer ce poate fi expirată forțat la sfîrșitul unei expirații normale.

Capacitatea vitală depinde de talie, sex, modul de viață, gradul de dezvoltare al aparatului respirator etc.

Determinarea sa prezintă un real interes practic, deoarece rezistența organismului la diferite activități fizice și în special la cele sportive este condiționată de o capacitate vitală normală.

Teoretic, capacitatea vitală se calculează după formula: C.V = I (înălțimea). factor X a cărui valoare este 20 pentru sexul feminin, 25 pentru bărbați și 29 pentru sportivi.

Capacitatea vitală astfel calculată se compară cu C.V măsurată practic.

Materialul necesar. Spirometrul, piesă bucală de sticlă, vată, alcool.

Spirometrele cele mai simple care se află în dotarea laboratoarelor școlare sînt de tip Barnes (Fig. 248). Ele se compun dintr-o cutie

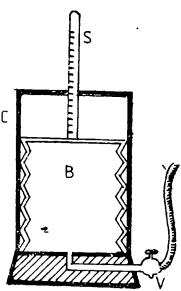


Fig. 248. Spirometrul Barnes (Explicații în text).

metalică cilindrică (C) și un burduf (B) din folie de polietilenă plasat în interior și în care se colectează aerul expirat de subiect. În centrul capacului metalic al burdufului, este fixat un capăt al unei rigle metalice, gradată în cm (S) de la 0—7000. Capătul superior al riglei iese la exterior printr-un orificiu aflat în centrul capacului cutiei.

Burdufui spirometrului se pune în legătură cu exteriorul printr-un tub metalic orizontal, aflat la partea inferioară (V), care se prelungește cu un tub de cauciuc, terminat cu o piesă bucală.

Modul de lucru. Plecîndu-se de la poziția „0" a riglei spirometrului, se dezinfectează piesa bucală cu alcool, se inspiră profund după care se blochează orificiile nazale (prin strîngerea cu degetele) și se face o expirație de profunzime, maximă, în spirometru, prin intermediul piesei bucale. Se citează pe riglă volumul de aer în ml. expirați. Valoarea citită reprezintă capacitatea vitală a subiectului.

10.7. FIZIOLOGIA ENDOCRINĂ

Acțiunea adrenalinei asupra melanoforilor. Melanoforii sînt celule pigmentate care conțin o substanță de culoare neagră — melanina (pigmentul).

Unele organisme (pești, amfibieni) realizează modificări rapide de culoare, ca urmare a distribuției pigmenților în celulele tegumentare — cromatofori.

Variațiile de distribuție a pigmenților cromatoforici se datoresc unor influențe nervoase și endocrine.

Materialul necesar. Cîteva exemplare de crap, acvariu, seringă, soluție de adrenalină, pensă.

Modul de lucru. Se plasează un acvariu care conține cîteva exemplare de crap într-o cameră nu prea luminată și se observă că solzii de pe tegumentul acestora capătă o culoare închisă.

Se injectează în masa musculară la două exemplare o mică cantitate de adrenalină (0,2 ml soluție 1%) și se constată o schimbare a colorației solzilor, aceștia se deschid la culoare în comparație cu animalele martor la care culoarea solzilor rămîne nemodificată.

Se scot cu ajutorul pensei cîțiva solzi și-i examinăm la microscop. Se observă că în solzul smuls de la peștele martor (netratat), pigmentul este răspîndit uniform în tot corpul și prelungirile melanoforilor, în timp ce la colzul obținut de la peștele injectat cu adrenalină, pigmentul este concentrat în centrul celulei devenind punctiform. Așa se explică decolorarea exemplarelor injectate cu adrenalină.

10.7.1. ACȚIUNEA TIROIDEI ASUPRA MORMOLOCILOR DE BROASCĂ

Modul de lucru. Se recoltează primăvara mormoloci de broască și se repartizează în loturi care se țin în acvarii diferite. Li se administrează drept hrană — carne proaspătă tocată foarte fin (resturile neconsumate se scot în aceeași zi ca să nu altereze apa). Lotului experimental i se adaugă în hrană și praf de tiroidă (obținut prin triturarea unor drajeuri din comerțul farmaceutic).

Se constată că metamorfoza exemplarelor care primesc tiroidă este mult accelerată (Fig. 249) ajungîndu-se în curs de cîteva săptămîni să se obțină forme adulte de talie mică. Această experiență interesantă și instructivă este indicată pentru „colțul naturii vii".

La un alt lot de mormoloci se administrează tiouracil, substanță care inhibă procesul enzimatic necesar utilizării iodului în sinteza tiroxinei, pentru a realiza o hipotiroidie prin trioidectomie farmacologică. Se vor obține mormoloci de talie mare, metamorfoza fiind foarte întîrziată față de lotul martor.

10.7.2. DIAGNOSTICUL ENDOCRIN AL SARCINII (TESTUL GALLI-MAININI)

Reacția Galli—Mainini este un test de sarcină care se utilizează în mod curent pentru diagnosticul timpuriu al sarcinii la femeie (după 15—20 zile de sarcină). El se bazează pe proprietatea hormonului foli-

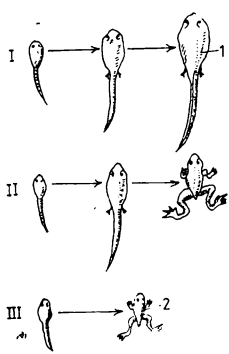


Fig. 249. Acțiunea glandei tiroide asupra metamorfozei broaștei : I — metamorfoza a fost suprimată prin tiroidectomie ; II — metamorfoză normală ; III — metamorfoză precoce prin ingestie de tiroidă ; 1 — mormoloc gigant ; 2 — broască pitică.

culostimulant (FSH) prezent în urina sau serul sanguin al femeii gravide de a provoca atunci cînd e injectat la broscoi, spermatogeneza și eliminarea spermatozoizilor.

Materiale necesare. Broscoi, seringă, urină de femeie gravidă, microscop, lame, lamele, pipete Pasteur, borcan de sticlă, hîrtie de filtru.

Modul de lucru. Femeia căreia dorim să-i facem diagnosticul nu va lua în preajma examinării nici un fel de medicament. Se recoltează urina de dimineață și se filtrează prin hîrtia de filtru.

Se ia un broscoi și cu ajutorul unei pipete se recoltează o picătură din lichidul din cloacă (nu se aspiră, deoarece lichidul urcă în pipetă prin capilaritate). Se pune o picătură de lichid pe o lamă de sticlă, se aplică lamela și se examinează la microscop. Dacă spermatozoizii lipsesc, animalel pot fi utilizate pentru reacție.

Se injectează în sacii limfatici dorsali 3 ml de urină filtrată și se pune animalul într-un borcan de sticlă, care se acoperă.

Pe fundul borcanului se aplică o hîrtie de filtru umectată sau puțină apă de la robinet. Borcanul acoperit cu tifon se pune la întunerio și la o temperatură de 20°—22°C. (Lumina și frigul întîrzie reacția).

După 1—2 ore de la injectarea urinei se examinează la microscop o nouă probă recoltată din cloaca broscoiului sau eventual din apa de pe fundul borcanului.

Prezența spermatozoizilor în cîmpul microscopului denotă o reacție pozitivă (prezența sarcinii).

Spermatozoizii de broscoi au forma unor mici bastonașe mobile (Fig. 250) și ei nu trebuie să fie confundați cu protozoarele care parazitează cloaca broscoiului.

În lunile martie—mai, cînd broaștele sînt în perioada de împerechere pot apare reacții fals negative.

Fig. 250. Spermatozoizi de broscoi.

10.8. FIZIOLOGIA EXCREȚIEI

Evidențierea substanțelor proteice din urină. Cunoașterea compoziției urinei prezintă o importanță practic deosebită; analiza ei fiind utilă, atît în stabilirea diagnosticului unor maladii, cît și pentru controlul modului cum evoluează acestea.

Pe baza analizelor chimice s-a stabilit că urina finală, în mod normal, nu conține substanțe proteice. Totuși și în urina finală există oarecare urme ale acestor substanțe rezultate din degradarea unor celule epiteliale descuamate de pe traiectul căilor urinare.

În urina patologică, din cauza unor dereglări ale metabolismului, este posibil să apară cantități remarcabile de substanțe proteice provenind din mediul intern.

Materialul necesar. Urină proaspătă, recoltată dimineața pe nemîncate, albuș de ou, eprubete, stativ pentru eprubete, pahare Berzelius, hîrtie de turnesol, acid acetic 10%, acid azotic, fericianură de potasiu 10%.

În lipsa unei urine patologice, care să conțină albumină, acest lucru se poate realiza în laborator prin adăugarea la 100 ml de urină normală, a 2 ml dintr-o soluție de albumină (soluția de albumină se obține dintr-un albus de ou proaspăt bătut cu 50 ml apă).

Modul de lucru

a) *Proba cu acid acetic.* Punem într-o eprubetă curată, 10 ml de urină proaspătă și controlăm reacția sa cu ajutorul hîrtiei de turnesol. Dacă reacția urinei este alcalină, atunci se adaugă 2—3 picături de acid azotic pentru a o acidula. Eprubeta cu urină este încălzită pînă la fierbere, și se adaugă încet cîteva picături de acid acetic 10%. În cazul cînd în urină se află albumină, aceasta se tulbură sau apare un precipitat alb.

b) *Proba cu ferocianuară de potasiu.* Într-o eprubetă se pun 10 ml de urină proaspătă, peste care se adaugă cîteva picături de acid acetic și cîteva picături de ferocianură de potasiu 10%. Se produce o tulburare sau un preciptat ce indică prezența albuminei în urină.

11. TEHNICI DE LABORATOR FOLOSITE ÎN MICROBIOLOGIE

Microbiologia este o știință relativ nouă, care are ca obiect de studiu microorganismele. Acestea alcătuiesc un grup vast și eterogen ca morfologie, activitate biologică și poziție sistematică, avînd drept caractere comune, dimensiunile microscopice care le fac invizibile cu ochiul liber, organizarea, în general, unicelulară și structura internă relativ simplă.

În acest grup sînt incluse bacteriile adevărate sau eubacteriile, bacteriile filamentoase sau actinomicetele, bacteriile albastre-verzi sau cianobacteriile, ciupercile microscopice (drojdiile și mucegaiurile), algele microscopice și protozoarele.

Microorganismele au o organizare celulară de tip procariot și eucariot. În tipul de organizare procariot sînt incluse bacteriile, iar celelalte microorganisme au o organizare celulară de tip eucariot.

Majoritatea microorganismelor sînt specii saprofite, prezente peste tot în natură, dar există și specii parazite, patogene, capabile să producă boli grave, la om, animale și plante. Pornind de la ideea că bacteriile care sînt utilizate în laborator ar putea cauza boli, trebuie avută o foarte mare atenție la modul în care sînt manipulate culturile, vasele de cultură, lamele pentru microscop și toate materialele care vin în contact cu microorganismele. Ca urmare, pentru buna desfășurare a oricărei lucrări practice de microbiologie, cît și pentru a evita infecția, atunci cînd se lucrează cu un microorganism patogen sau cu un produs patologic recoltat de la un bolnav, este necesară cunoașterea tehnicilor utilizate în cadrul laboratorului de microbiologie și în special a celor de sterilizare, de însămînțare, de conservare a culturilor microbiene, de preparare a mediilor de cultură și celelalte.

11.1. METODE DE STERILIZARE

Sterilizarea reprezintă operația de înlăturare sau de distrugere a microorganismelor (formă vegetativă, cît și spor) prezente într-un mediu sau pe instrumentele și obiectele de laborator cu care lucrăm.

Cunoașterea operațiilor de sterilizare reprezintă prima etapă și cea mai importantă, de modul de lucru steril depinzînd reușita unei lucrări de microbiologie.

După natura agentului folosit, există două categorii de metode de sterilizare, și anume :

1. metode de sterilizare cu ajutorul agenților fizici ;
2. metode de sterilizare cu ajutorul agenților chimici.

Alegerea metodelor de sterilizare se face în funcție de natura materialului ce urmează a fi sterilizat.

11.1.1. STERILIZAREA CU AJUTORUL AGENȚILOR FIZICI

Reprezintă metoda cel mai frecvent folosită în cadrul laboratorului de microbiologie.

După natura agentului fizic folosit există mai multe metode de sterilizare și anume :

a) sterilizarea prin căldură care poate fi umedă sau uscată ;
b) sterilizarea prin filtrare ;
c) sterilizarea prin centrifugare ;
d) sterilizarea cu ajutorul radiațiilor ultraviolete ;
e) sterilizarea cu ajutorul ultrasunetelor.

11.1.1.1. Metode de sterilizare prin căldură

Căldura este agentul fizic cel mai la îndemînă și ca urmare cel mai des utilizat în laborator. Acțiunea distrugătoare a căldurii se exercită diferențiat în funcție de forma vegetativă (distrusă la t° de sub 100°C) și de spor (distrus la t° mai ridcate de 100°C) și se manifestă fie prin degradarea proteinelor fie prin carbonizarea microorganismelor.

Sterilizarea prin căldură uscată — are ca principiu degradarea proteinelor.

Se realizează prin mai multe metode :

— încinerarea sau arderea ;
— încălzirea pînă la roșu ;
— flambarea ;
— sterilizarea prin aer cald.

Incinerarea sau arderea — metodă de sterilizare care constă în distrugerea animalelor folosite în laborator, precum și a materialelor care au servit ca pansament pentru răni. În acest scop se folosesc cuptoare speciale sau crematorii.

Încălzirea pînă la roșu — constă în încălzirea pînă la incandescență a obiectului de sterilizat în flacăra unui bec de gaz. Metoda se aplică numai în cazul unor obiecte metalice : anse, spatule, ace de seringă etc.

Ansele sînt instrumentele cu ajutorul cărora se însămînțează, se recoltează microorganismele, se realizează preparatele microscopice. Ansa este alcătuită dintr-un filament bun conducător de căldură, prevăzut la un capăt cu o buclă. Celălalt capăt al filamentului este fixat la un mîner de lemn numit, port-ansă (Fig. 251).

Ansa se sterilizează prin această metodă în felul următor : orice lucrare de microbiologie se efectuează în fața unui bec de gaz aprins ; se ia în mîna dreaptă și se ține în poziție cît mai verticală în vîrful flăcării beculuі de gaz, astfel încît tot filamentul să fie în flacără

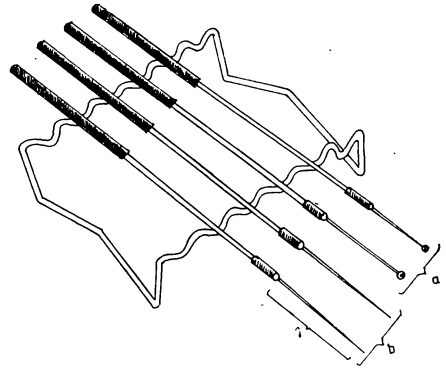


Fig. 251. Tipuri de anse: a— cu buclă; b — fără buclă; c — fir metalic.

(Fig. 252). În cîteva secunde filamentul ansei se înroşeşte (fiind un metal bun conducător de căldură). Se trece apoi ansa pe toată lungimea ei prin flacăra becului de gaz (Fig. 252), se lasă cîteva secunde să se răcească (pentru a nu omorî microorganismele) şi se lucrează cu ea. După ce a fost folosită, ansa se sterilizează în acelaşi mod şi se pune în cutia de pe masă.

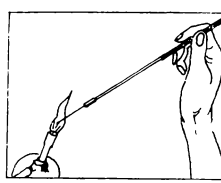


Fig. 252. Sterilizarea ansei prin încălzire pînă la roşu.

Sterilizarea prin flambare — constă în trecerea obiectului de sterilizat, de cîteva ori rapid prin flacăra unui bec de gaz. Prin această operaţie sînt distruse microorganismele de pe suprafaţa obiectelor respective. Se sterilizează prin flambare următoarele obiecte:

— lama de sticlă.

— pipete gradate — înainte de întrebuinţare, ulterior sînt introduse în vase cu amestec oxidant, dezifectant

— pipete Pasteur
— mînerul ansei
— gîtul eprubetelor şi al flacoanelor Erlenmayer (înainte şi după utilizare).

Sterilizarea prin aer cald — cea mai eficientă metodă de sterilizare prin căldură uscată. Se realizează într-un aparat special numit cuptor Pasteur sau pupinel. Acesta este format dintr-o cutie de formă cilindrică sau paralelipipedică cu pereţi dubli de tablă prevăzută cu un sistem de încălzire cu un termometru, care permite controlul temperaturii. În interior se găsesc rafturi de sticlă metalică pentru aşezarea obiectelor de sterilizat. În pupinel se sterilizează următoarele obiecte: sticlăria de laborator (eprubete, pahare Berzelius, plăci Petri, pipete gradate, tuburi de sticlă destinate pregătirii pipetelor Pasteur, seringi de sticlă Louer, fiole. flacoane) precum şi cele din porţelan : majore, capsule etc.

Nu se sterilizează obiecte din cauciuc sau eprubete cu dop de cauciuc.

Obiectele curate, perfect uscate şi împachetate în hîrtie sînt aşezate în rafturi la distanţă de peretele interior pentru a evita carbonizarea hîrtiei şi a dopurilor de vată. Se închide ermetic aparatul şi se deschide curentul. Sterilizarea durează o oră după ce temperatura în interior a atins 180°C. După sterilizare se închide sursa de căldură şi se lasă aparatul să se răcească. Deschiderea prematură a aparatului determină variaţii bruşte de temperatură, ceea ce duce la spargerea sticlăriei. Obiectele se scot numai atunci cînd temperatura interioară atinge temperatura camerei. Materialele sterilizate sînt păstrate în dulapuri bine închise.

În timpul sterilizării hîrtia şi vata capătă o culoare uşor gălbuie — indice al unei bune sterilizări. În cazul în care s-a depăşit temperatura de 180°C, hîrtia sau vata se carbonizează. În acest caz, obiectele nu mai pot fi folosite, deoarece prin degradarea vatei şi hîrtiei se degajă un gudron care este bogat în substanţe antiseptice, a căror prezenţă împiedică dezvoltarea microorganismelor ce vrem să le cultivăm. Aceste obiecte trebuie sterilizate din nou.

Pentru controlul sterilizării se mai foloseşte testul caramelizării zaharozei la 180°C, introdusă în tubuşoare de sticlă, plasate la diferite nivele în interiorul pupinelului.

Metode de sterilizare prin căldură umedă

Căldura umedă este mai eficentă decît căldura uscată deoarece are o mare putere de penetraţie distrugînd microorganismele într-un timp mai scurt şi la o temperatură mai joasă.

Metodele de sterilizare prin căldură umedă sînt fierberea, pasteurizarea, tindalizarea şi sterilizarea prin vapori de apă sub presiune.

Fierberea — metodă de sterilizare prin căldură umedă, folosită pentru sterilizarea instrumentelor metalice (pense, foarfeci etc.), seringilor etc. Se sterilizează într-un fierbător electric prevăzut în interior cu un grătar pe care se aşează obiectele de sterilizat la distanţă unele de altele pentru a evita ruginirea. Se adaugă apă distilată şi fierberea durează 30 minute din momentul în care temperatura apei a atins 100°C. Fierberea nu este o metodă completă de sterilizare, deoarece, la această

temperatură sînt distruse numai formele vegetative în timp ce sporii rezistă. De aceea obiectele sterilizate prin fierbere trebuie folosite imediat după sterilizare. În apa de fierbere se adaugă borax sau carbonat de sodiu 4—5% pentru a evita ruginirea instrumentelor metalice și a ridica cu cîteva grade punctul de fierbere a apei.

Dat fiind faptul că fierberea este o metodă incompletă de sterilizare, nu se mai recomandă sterilizarea seringilor prin fierbere.

Pasteurizarea — metodă imaginată de Pasteur, ce constă în încălzirea mediilor lichide la temperaturi cuprinse între 56—90°C, timp invers proporțional cu temperatura (30′—2′), în funcție de natura produsului respectiv. Este o metodă incompletă de sterilizare, în care sînt distruse numai formele vegetative. Ca urmare, o condiție obligatorie a pasteurizării este răcirea bruscă la +4°C a lichidelor supuse sterilizării pentru a împiedica germinarea sporilor rămași și rezistenți.

Această metodă se folosește în special în industria laptelui, avînd drept scop distrugerea microorganismelor patogene din lapte.

Tindalizarea — metodă de sterilizare descrisă de Tyndall care se aplică mediilor lichide care prin compoziția lor nu suportă temperaturi de peste 100°C (medii de cultură care conțin zaharuri, proteine etc.). Este o metodă completă de sterilizare distrugînd atît forma vegetativă cît și sporii, constînd din 3 pasteurizări repetate la intervale de 24 ore timp în care mediile sînt păstrate la temperatura camerei pentru a favoriza germinarea sporilor. Celulele vegetative vor fi distruse prin încălzirea următoare.

Sterilizarea prin vapori de apă sub presiune numită și autoclavare, deoarece aparatul folosit în acest scop se numește autoclav. Este cea mai eficientă și cea mai utilizată metodă de sterilizare. Autoclavarea este folosită pentru toate mediile de cultură care suportă temperaturi ridicate · materiale infectate, seringi de sticlă, obiecte de cauciuc, filtre bacteriene etc., precum și a culturilor și a mediilor scoase din experiență.

Principiul autoclavării : temperatura vaporilor de apă într-un vas închis crește proporțional cu presiunea la care sînt supuși. Ca urmare a puterii mari de penetrație a vaporilor, timpul necesar unei sterilizări complete este de 20—30′. Temperatura diferă în funcție de natura materialului ce urmează a fi sterilizat. În cele mai multe cazuri se obține o sterilizare completă la 115—120°C (1/2—1 atmosferă), timp de 20—30′.

Mediile de cultură sterilizate prin autoclavare sînt păstrate 24 ore la termostat la temperatura optimă de creștere a bacteriilor pentru a verifica dacă sterilizarea s-a făcut bine. Dacă sterilizarea nu a fost realizată corect, atunci mediile lichide se tulbură (ceea ce denotă dezvoltarea microorganismelor), iar pe cele solide apar colonii de microorganisme.

11.1.1.2. Filtrarea

Filtrarea este o metodă de sterilizare care se aplică unor substanțe ce se modifică sub acțiunea căldurii (lichide biologice, toxine bacteriene, unele medii de cultură).

Constă în trecerea unui lichid printr-o substanță poroasă care reține microorganismele. Nu este o metodă de sterilizare perfectă deoarece virusurile și chiar unele bacterii cu dimensiuni mai mici pot traversa porii filtrelor.

Pentru filtrare se folosesc mai multe tipuri de filtre care în funcție de natura materialului poros aparțin următoarelor categorii :

— filtre de porțelan poros Chamberland numite și bujii notate cu litera L urmată de o cifră ($L_1 \ldots L_{13}$) în funcție de dimensiunile porilor. L_3 reține bacteriile ;

— filtre din azbest — Seitz notate EK (EK_1—EK_2). Filtrele EK_1 rețin bacteriile, iar filtrele EK_2 rețin unele virusuri cu dimensiuni mai mari ;

— filtre de sticlă — Jena — notate cu litera G (G_1—G_5) filtrele G_5 rețin bacteriile. Sînt cel mai des utilizate în lucrările de microbiologie, deoarece filtrează repede, se pot folosi de mai multe ori prin regenerare etc. ;

— filtre de membrană — milipore (3—5000 μm), folosite în special în virologie.

Toate aceste tipuri de filtre se adaptează prin intermediul unui dop de cauciuc la un vas de vid numit balon Kitasato (Fig. 253). Fil-

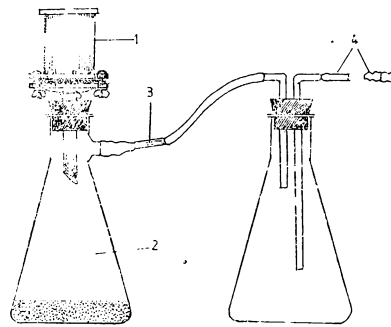


Fig. 253. Instalație de filtrare : 1. filtru Seitz ; 2. balon Kitasato ; 3. dop de vată ; 4 linia de vacuum.

trul împreună cu balonul Kitasato se sterilizează la autoclav la 115°C timp de 30 min. După sterilizare, balonul Kitasato se adaptează la pompa de vid prin intermediul tubului lateral.

Trecerea lichidelor de sterilizat prin porii filtrului se face prin aspirație, realizată cu ajutorul pompei de vid.

Filtrarea este o operație care servește la separarea corpilor microbieni de mediul de cultură în care s-au dezvoltat, în enzimolgie, precum și la prepararea unor vaccinuri.

11.1.1.3. Sterilizarea cu radiații ultraviolete

Sterilizarea cu raze ultraviolete este o metodă completă de sterilizare folosită pentru sterilizarea unor medii transparente care permit trecerea acestor radiații. Astfel, razele ultraviolete sînt folosite pentru

sterilzarea apei potabile într-un strat subțire, a încăperilor și a boxelor pentru lucru steril, precum și a spitalelor de boli transmisibile. Cele mai active radiații ultraviolete sînt cele cu $\lambda = 2540—2800$ A.

11.1.1.4. Sterilizarea cu ultrasunete

Sterilizarea cu ultrasunete — metodă completă de sterilizare folosită în special pentru sterilizarea unor produse alimentare (sucuri de fructe) deoarece acestea nu modifică compoziția chimică și gustul. Ultrasunetele produc moartea bacteriilor prin liza peretelui celular și eliberarea consituenților în mediu.

11.1.2. STERILIZAREA CU AJUTORUL AGENȚILOR CHIMICI

Substanțele chimice folosite ca agenți de sterilizare sînt de două categorii, respectiv antiseptice și dezinfectante cu activitate microstatică și respectiv microbicidă.

În laboratoarele de microbiologie și în spitalele de boli transmisibile, dezinfectantele sînt folosite pentru distrugerea bacteriilor de pe mîini, mesele de lucru, dușumelele, produsele patologice. În compoziția unor medii de cultură selective sînt înglobate substanțe antiseptice ca: verde briliant, cristal violet, roșu de Congo sau verde malachit, care prin acțiunea lor selectivă inhibă creșterea unor specii microbiene favorizînd dezvoltarea altora.

Principalele substanțe antiseptice folosite în microbiologie sînt:

— acidul sulfuric, acidul acetic, boric, clorhidric etc. În special sub formă de amestec sulfocromic pentru spălarea și dezinfecția sticlăriei de laborator.

— compuși halogenați: tinctura de iod, cloramina (soluția apoasă 1% pentru mîini, cloramina în concentrații de 5—6% pentru mesele de laborator, cuști de animale și produse patologice ca sputa și materii fecale).

— compuși oxidanți: apa oxigenată 5%, permanganat de postasiu 1% sau clorat de potasiu pentru mucoase;

— alcoolul, sub forma de alcool etilic 70% este cel mai folosit la dezinfecția mîinilor;

— formolul (soluție apoasă 5% — dezinfectant al suprafețelor);

— săruri ale metalelor grele: biclorura de mercur (1%) pentru dezinfecția suprafețelor și a mîinilor; azotatul de argint (1%) pentru instalații conjunctivale.

11.2. MEDIILE DE CULTURĂ

11.2.1. PRINCIPII PRIVIND MEDIILE DE CULTURĂ

Mediile de cultură reprezintă un amestec de substanțe nutritive destinate creșterii și multiplicării microorganismelor precum și studiului microorganismelor în afara nișei lor ecologice naturale.

Izolarea unui microorganism din mediile naturale: apă, sol, lapte, diferite produse patologice etc., obținerea microorganismelor în culturi pure separate de germenii asociați, identificarea însuși a unui micro-

organism prin descrierea caracterelor de cultură, de colonie și biochimice, implică cultivarea microorganismelor pe diferite produse sau extracte naturale și artificiale, care sînt mediile de cultură.

Criteriul eficienței unui mediu de cultură este acela de o oferi microorganismelor cultivate conditii optime de cultivare. Mediile de cultură oferă microorganismelor substanțele necesare creșterii și multiplicării. Ele reprezintă și substratul energetic necesar desfășurării în condiții optime a tuturor funcțiilor metabolice ale celulei.

În general mediile de cultură trebuie să îndeplinească următoarele condiții :

— să conțină toate substanțele nutritive (sursă de carbon, sursa de azot, ioni, săruri minerale, factori de creștere) într-o formă asimilabilă de către microorganisme ;

— să aibe un anumit pH, corespunzător pH optim de dezvoltare la bacterii este de 7,0—8,0 ; pH optim pentru drojdii este de 2,0—5,5) ;

— să fie sterile pentru a permite creșterea în cultură pură a microorganismului însămînțat ;

— să satisfacă exigențele de respirație în funcție de tipul respirator (aerob sau anaerob).

Ingredientele care intră în compoziția unui mediu de cultură precum și prepararea și sterilizarea lui sînt stabilite astfel încît să satisfacă toate condițiile unui mediu optim.

Toate mediile de cultură conțin apă care este cerută de microorganisme. Pe lîngă aceasta, carbonul, oxigenul, hidrogenul, sulful, potasiul, calciul, magneziul și fierul trebuie să fie prezente în mediu în forma utilizabilă de microorganism.

Numeroase microorganisme depind în creșterea lor de prezența în mediu a unor urme de magneziu, molibden, zinc, cupru etc.

Unele microorganisme necesită condiții particulare de creștere, ceea ce implică adăugarea în mediu a unor factori de creștere reprezentați de aminoacizi, vitamine, purine sau alte substanțe pe care nu sînt capabile să și le sintetizeze singure.

Carbonul este adăugat în mediu sub forma compușilor organici care cel mai adesea servesc și ca sursă de energie.

Oxigenul provine cel mai adesea din compuși organici, iar în cazuri speciale particulare, din compuși anorganici.

Majoritatea microorganismelor își obțin azotul necesar din sărurile sale (sub formă de nitrați, nitrit sau amoniu, sau din compuși complecși cum sînt aminoacizii, peptidele, proteinele). Aceste elemente necesare creșterii sînt preluate din sărurile introduse în mediul de cultură.

11.2.2. PRINCIPALELE INGREDIENTE CARE INTRA ÎN COMPOZIȚIA UNUI MEDIU DE CULTURĂ

Peptonele — substanțe solubile în apă obținute din hidroliza enzimatică a proteinelor. Sînt amestecuri de peptide a căror compoziție este diferită în funcție de proteina din care provin și de enzima folosită. Pot fi deosebite pe baza conținutului în vitamine (diferențiate) și carbohidrați. Proteinele din care se obțin peptonele provin din cazeină, carne, gelatină sau soia. Hidroliza enzimatică a acestora se realizează cu tripsină, pepsină, papaină sau suc pancreatic.

— *hidrolizatele* — sînt amestecuri de peptide cu greutate moleculară mare sau mică și amonoacizi care se obțin din proteine prin metode anorganice.

Hidrolizatul de cazeină se obține prin hidroliza acidă a cazeinei în urma căreia vitaminele și alte substanțe care favorizează creșterea sînt distruse. Hidrolizatul de cazeină astfel obținut este utilizat pentru prepararea mediului folosit pentru determinarea concentrației de vitamine din medicamente, hrana animalelor etc.

Hidrolizatul de cazeină care are un conținut mai ridicat în vitamine și alți factori de creștere este folosit pentru cultivarea microorganismelor folosite în producerea de toxine și vaccinuri.

— *extractele* — sînt obținute prin fierberea substratului în apă și apoi evaporarea apei din soluția rezultată pînă la obținerea unei pudre. Sînt bogate în proteine cu greutate moleculară mică și factori de creștere.

Extractul de carne (meat extract) se obține din carne de vită slabă tocată și lăsată la macerat 24 ore sub apă rece, după care se fierbe și se filtrează. Este lipsit de carbohidrați și conține în principal sursa de azot. Este un ingredient optim pentru mediile de fermentație. Se prezintă sub formă de pulbere galbenă.

Extractul de drojdii (yeast extract) se obține din autolizatul drojdiei de bere prin evaporarea apei. Are un conținut bogat în vitamine din grupul B, oferind condiții excelente de creștere unui număr mare de bacterii și fungi microscopici. Se prezintă sub formă de pulbere.

Extractul de malț (malt extract) se obține din malțul de orez. Are un conținut ridicat de carbohidrați (mai ales maltoză) fiind folosit în special pentru prepararea mediilor folosite pentru cultivarea drojdiilor și mucegaiurilor.

Extractul de porumb (corn steep) — conține vitamine din grupul B și aminoacizi și are un pH destul de acid. Se prezintă sub formă de pastă.

Pentru a se obține un mediu de cultură solid se adaugă soluției nutritive lichide o serie de ingrediente cu rol de solidificare :

— agar-agarul — este un agent ideal pentru solidificare. Se obține dintr-o algă roșie *(Gellidium sp.)* și se prezintă sub formă de fibre sau pulbere albă. Adăugarea a 10—15 g agar-agar la litrul de mediu este suficientă pentru a se obține un mediu solid.

Pentru selecționarea și diferențierea microorganismelor, în mediile de cultură se adaugă diferite substanțe. Substanțele selective favorizează creșterea preferențială a unor microorganisme, inhibînd sau încetinind creșterea altor microorganisme.

Substanțele folosite în scopul diferențierii microorganismelor, nu influențează creșterea acestora. Ele permit identificarea unui microorganism față de altul pe baza caracterelor metabolice.

Aceste substanțe pot reacționa cu produșii metabolici care sînt produși numai de anumite microorganisme. Reacțiile între reactivi și diferiți produși de metabolism pot duce la schimbări în mediul de cultură (culoarea modificată și formarea de gaz) sau pot modifica aspectul coloniilor (acumularea unui pigment colorat). În acest scop mediile de cultură pot conține indicatori de pH, dintre care cei mai des întîlniți

sînt : roşu fenol, bromcresol, roşu neutru, albastru de brom timol, albastru de bromfenol, albastru timol etc. Indicatorii de pH menţionaţi sînt adăugaţi în mediu pentru detectarea producerii de acizi organici şi solvenţi organici, proprietate specifică unor microorganisme.

Albastru de metilen şi resazurina sînt folosiţi ca indicatori redox. Culoarea lor indică prezenţa sau absenţa oxigenului.

Substanţele selective de tipul cristalului violet sau verde briliant, inhibă creşterea bacteriilor Gram pozitive.

Clorura de sodiu, citratul de sodiu, teluritul de potasiu, selenitul de sodiu, clorura de litium, sărurile biliare şi alte numeroase săruri sînt adăugate în mediul de cultură pentru selecţionarea anumitor microorganisme.

Antibioticele reprezintă un alt grup de substanţe selective care se adaugă în mediul de cultură. Cloramfenicolul, cicloheximida şi sulfamidele sînt rezistente la căldură şi ca urmare pot fi adăugate în mediul de cultură înainte de sterilizare. Neomicina, polimixina B sînt mai puţin stabile la căldură şi se adaugă în mediu în mod steril, după ce acesta a fost sterilizat la autoclav.

Microorganismul obligat anaerob creşte numai atunci cînd concentraţia de oxigen este mică sau cînd potenţialul redox are o valoare foarte mică. Scăderea potenţialului redox poate fi realizată prin adăugarea acidului ascorbic, tioglicolatului de sodiu, hidrosulfatului de sodiu, cisteinei etc.

Pentru cultivarea microorganismelor extrem de pretenţioase (cum sînt de exemplu microorganismele patogene), în mediul de cultură se adaugă diferite lichide biologice care aduc o serie de factori de creştere necesari pentru dezvoltarea microorganismului respectiv. Astfel, sîngele şi derivaţii lui, serul şi plasma, pot fi folosiţi ca surse de creştere pentru microorganismele care sînt deosebit de pretenţioase în ceea ce priveşte necesităţile nutriţionale.

Bulionul nutritiv (peptonă şi extract de carne) şi *geloza nutritivă* (peptonă, extract de carne şi agar-agar) sînt considerate medii nutritive de bază în activitatea de laborator.

După natura substanţelor care intră în compoziţia lor mediile de cultură pot fi : *medii naturale* (fragmente de organe sau ţesuturi animale sau vegetale, sucuri de fructe, infuzii de plante) şi *medii artificiale* sau sintetice, care au compoziţia cunoscută atît calitativ cît şi cantitativ, fiind preparate din substanţe anorganice, adesea organice, de concentraţii bine cunoscute. Sînt mediile cel mai ades întrebuinţate pentru diferite activităţi de laborator.

Atît mediile naturale cît şi cele sintetice, pot fi în funcţie de consistenţa lor medii lichide, semilichide şi solide.

Mediile deshidratate prezentate sub formă de pulbere sau granule oferă avantajul că sînt economice şi uşor de folosit în laborator. Procedeele standardizate de preparare a mediilor deshidratate asigură reproductibilitatea bună a rezultatelor obţinute pe aceste medii.

Mediile deshidratate satisfac atît necesităţile nutriţionale ale diferitelor microorganisme cît şi cerinţele experimentale ale cercetării ce urmează a fi realizată.

Mediile de cultură folosite în bacteriologie care permit creşterea majorităţii microorganismelor şi în special a bacteriilor sînt medii simple sau medii uzuale (lichide, semilichide şi solide). Exemple de medii uzuale :

— lichide : bulion nutritiv, apa peptonată, laptele simplu, must de malţ etc. ;

— semisolide : gelatina, geloza nutritivă 0,5% ;

— solide : geloza nutritivă (bulion nutritiv + agar-agar).

Pe lîngă aceste categorii de medii de cultură există şi alte medii de cultură ca :

a) medii complexe (medii uzuale + lichide biologice) ex. : bulion + sînge, geloză + sînge, pentru izolarea şi cultivarea streptococilor şi stafilococilor patogeni, bulion + lichid de ascită şi geloză nutritivă + lichid de ascită pentru cultivarea meningococului, gonococului ;

b) medii speciale — majoritatea mediilor sintetice, care conţin substanţe selective, indicatori de pH, diferiţi reactivi care permit fie creşterea preferenţială a unui microorganism, fie evidenţierea anumitor proprietăţi biochimice caracteristice unei specii microbiene.

Mediul ASHBY pe care se dezvoltă numai microorganisme fixatoare de azot, libere, aerobe din genul Azobacter :

— mediu Gauze — pentru izolarea şi cultivarea bacteriilor filamentoase din grupul actinomicetelor ;

— mediile Roulin, Czapek, Sabourand — pentru cultivarea mucegaiurilor ;

— mediul Loewenstein — conţine citrat de sodiu şi se foloseşte în vederea izolării şi cultivării bacilului Koch ;

— mediul Levin — de culoare roşie violacee (eozin — albastru de metilen) folosit pentru evidenţierea coloniilor de *E. coli* (negricioase cu luciu metalic) faţă de celelalte enterobacterii din apă ;

— mediul de bilă uscată (Istrati-Meitert) folosit pentru diferenţierea *E. coli* faţă de *Salmonella* şi *Proteus*.

Mediile speciale pot fi selective şi elective pentru izolarea microorganismelor, diferenţiale sau de identificare a unor microorganisme.

c) medii de conservare a microorganismelor — folosite pentru menţinerea în viaţă a culturilor de laborator.

11.2.3. ETAPELE PREPARARII UNUI MEDIU DE CULTURA

1. Stabilirea compoziţiei mediului de cultură în funcţie de scopul urmărit.

2. Cîntărirea şi dizolvarea în jumătate din cantitatea de apă, la cald a ingredientelor de bază, după indicaţiile formulei de preparare.

3. Adăugarea restului de apă şi corectarea pH- mediului cu ajutorul metodei colorimetrice sau a celor electrometrice. Se preferă metodele colorimetrice pentru că nu necesită instalaţii speciale şi sînt satisfăcătoare lucrărilor de laborator. În acelaşi scop se mai poate folosi hîrtia de pH şi soluţiile de NaOH 10% sau HCl 10%.

4. Filtrarea prin hîrtie de filtru sau vată, în cazul în care reţeta nu are alte indicaţii. La mediile agarizate filtrarea se realizează înainte de adăugarea agarului.

5. Repartizarea mediului în recipiente de sticlă : tuburi sau pahare Erlenmayer într-o cantitate stabilită în funcție de tipul și dimensiunea vasului. Volumul mediului lichid repartizat nu trebuie să depășească 3/4 din capacitatea vasului. Mediile solide se repartizează în eprubete sau în plăci Petri, după sterilizare, cînd sînt calde.

6. Sterilizarea mediilor în funcție de natura substanțelor ce intră în compoziția mediului. Majoritatea mediilor de cultură se sterilizează prin autoclavare la o presiune și un timp indicat de formula de preparare.

Pentru unele medii complexe sau speciale sterilizarea se face prin tindalizare sau fierbere în baie de apă.

Trebuie respectată și controlată permanent temperatura și timpul de sterilizare indicat în rețeta de preparare. Dacă nu sînt respectate condițiile de sterilizare pot apare modificări ale compoziției mediului nefavorabile creșterii și multiplicării microorganismelor. După o încălzire prelungită zaharurile caramelizează colorînd mediul în maro. Glicoproteinele precipită sub forma unui precipitat alb. O serie de chimicale se evaporă sau sînt inactivate după o încălzire prelungită.

7. Controlul mediilor după sterilizare. Aceasta se realizează prin păstrarea mediilor la termostat la 37°C timp de 24—48 ore. Dacă pe medii apar creșteri de microorganisme înseamnă că mediile nu sînt sterile, ceea ce impune repetarea operației de sterilizare.

Prepararea unui mediu simplu (uzual) :

— Bulionul de carne :

—Materiale necesare : extract de carne 3 g ; peptonă — 10 g ; NaCl — 5 g ; apă distilată 1000 ml ; 1 balon Erlenmayer de 1500 ml, hîrtie de pH, soluție NaOH 10% și HCl 10%, 1 cilindru gradat de 1000 ml, pipete Pasteur, balanță tehnică, greutăți pentru balanță, autoclav.

Tehnica de lucru : în balonul Erlenmayer se introduce jumătate din cantitatea de apă indicată în rețetă. Se cîntăresc substanțele și se dizolvă la cald extractul de carne și peptona. După dizolvarea completă a acestora se adaugă NaCl și restul de apă, se lasă să se răcească și se ajustează pH la valoarea 7,2—7,6 cu o soluție NaOH 10% sau HCl 10%. Mediul se repartizează în balonul Erlenmayer care se astupă cu dop de vată ce se acoperă apoi cu capișon de hîrtie legat cu sfoară. Se notează pe capișonul de hîrtie denumirea mediului și se sterilizează la autoclav la 120°C timp de 15 min. După sterilizare se poate păstra la întuneric și la temperatura camerei cîteva săptămîni. Dacă se folosește imediat după sterilizare se repartizează steril în eprubete sterile sau în baloane Erlenmayer sterile.

Geloza sau agarul nutritiv

Materiale necesare : bulion de carne peptonat — 1000 ml, agar-agar — 15—20% sub formă de fibre sau pulbere, 1 balon Erlenmayer de 1500—2000 ml capacitate, hîrtie indicator, NaOH 10%, HCl 10%, cilindru de 1000 ml, balanță tehnică, foarfecă, vată, filtru, autoclav.

Tehnica de lucru — se măsoară în cilindru 1000 ml bulion nutritiv și se repartizează în balonul Erlenmayer. Se determină pH care se corectează dacă este nevoie cu NaOH — 10% sau HCl — 10% în jurul valorii 7,2—7,6. Dacă se folosește agarul sub formă de fibre acestea se

taie în fragmente mici și se adaugă bulionului fierbinte. Amestecul se filtrează prin vată, iar filtratul obținut se trece în balonul Erlenmayer care se astupă cu dop de vată și capișon de hîrtie. Sterilizarea la autoclav se face timp de 20 minute la 120°C.

După sterilizare, dacă se lucrează cu geloză nutritivă mediul încă cald se repartizează în tuburi sau în plăci Petri. Dacă se folosește după mai mult timp de la sterilizare, mediul se ține în baie de apă pentru fierbere și apoi se repartizează steril în eprubete sau plăci Petri în funcție de scopul urmărit.

11.2.4. CULTIVAREA ÎN CONDIȚII DE AEROBIOZA ȘI ANAEROBIOZA

În cazul microorganismelor aerobe, mediile lichide se repartizează în vase de capacitate cît mai mare în strat cît mai subțire pentru a asigura o bună aerare.

Mediile solide pentru aerobi, se solidifică înclinat (se repartizează în eprubete și se păstrează pe masa de lucru în poziție orizontală pînă la solidificarea completă) pentru a avea o suprafață mare de contact cu aerul.

Condițiile de anaerobioză pot fi realizate prin trei tipuri de metode : fizice, chimice și biologice.

Indiferent de metoda folosită, mediul se repartizează în vase de capacitate mică și în strat cît mai înalt pentru a asigura cel puțin la fundul vasului condițiile de anaerobioză. Deasupra mediului se poate adăuga fie un strat subțire de agar 0,5%, care crează o peliculă vîscoasă prin care oxigenul pătrunde mai greu, fie un strat de ulei de parafină sau vaselină steril.

a) metodele fizice — constau în tehnica vidului respectiv — plasarea plăcilor Petri cu mediul însămînțat în exicatorul de vid. Această metodă poate fi combinată cu cultivarea în gaz inert H_2, He.

Mediile lichide pentru anaerobi înglobează CO_2 prin fierbere în baia de apă timp de 10 minute. Prin răcire bruscă se împiedică pătrunderea oxigenului.

b) metodele chimice — constau în introducerea în mediul de cultură a unor substanțe cu rol reducător (glucoza) sau a unor fragmente de țesuturi animale sau vegetale cu rol reductor : ficat, splină, rinichi, în boabe de orez în curs de germinare, boabe de struguri.

c) metodele biologice — constau în cultivarea pe aceeași placă, pe care median s-a trasat un șanț cu un cuțit steril, a unui microorganism aerob și a unuia anaerob.

11.2.5. CONSERVAREA MEDIILOR DE CULTURA

Odată preparate mediile de cultură au o stabilitate limitată. Dacă nu pot fi folosite imediat, cel mai bine sînt conservate la întuneric și la o temperatură de 4°C (de exemplu în congelator). Anumite medii de cultură (ex. mediile cu tioglicolat) se păstrează mai bine la temperatura camerei. Pentru a le proteja de uscare se adaugă un plastic steril peste dopul de vată.

11.3. METODE DE RECOLTARE, CONSERVARE ȘI TRANSPORT A PRODUSELOR PATOLOGICE

Natura diferită a produselor patologice (lichide din cavitățile seroase, articulare, urină, sînge, spută, fecale etc.) implică utilizarea unor metode de recoltare diferențiate în funcție de produsul respectiv. Indiferent de natura produsului, trebuie respectate regulile de procedură în toate operațiile de recoltare și de manipulare a probelor recoltate pentru a evita contaminarea cu alte microorganisme decît cele eventual prezente în ea și pentru a nu răspîndi în jur eventualele microorganisme patogene prezente în proba recoltată.

Recoltarea unui produs patologic, necesită cunoașterea unor reguli de procedură, care asigură executarea în condiții optime a examenului microbiologic de laborator. Acestea sînt :

— folosirea unor recipiente curate și sterile ;

— evitarea contactului cu antiseptice rămase în recipiente ;

— etichetarea recipientelor cu denumirea probei, sursa de unde a fost recoltată, ora recoltării și completarea unei fișe cu date despre bolnav (numele și prenumele, vîrsta, sexul, adresa etc.) ;

— expedierea cît mai rapidă a probelor la laborator ;

— ambalarea probei recoltate cît mai ermetic cu putință spre a se evita contaminările prin contactul cu mediul înconjurător.

Odată ajunse pe masa de laborator, produsele patologice vor fi triate și păstrate numai acelea care respectă condițiile de prezentare, în ceea ce privește cantitatea, modul de ambalare și condițiile în care au fost prelevate de la bolnav ; înregistrate și etichetate cu numărul de ordine al laboratorului ; prelucrate imediat, în cazul în care prin păstrare ar apare modificări ce pot afecta valabilitatea examenului microbiologic. Pentru a evita apariția în timp a unor modificări trebuie luate următoarele măsuri : păstrarea probei la frigider, la adăpost de razele solare și de uscăciune, folosirea unor medii așa numitele medii „de transport", ca de exemplu :

— mediul de transport al probelor recoltate din infecțiile gonococice conține : acid tioglicolic 0,2 ml ; soluție 20% glicerofosfat de sodiu 10 ml ; soluție 1% $CaCl_2$ 2 ml ; soluție albastru de metilen 1% — 0,04 ml, apă distilată 190 ml. Mediul se repartizează în eprubete de 120/10 mm cîte 2 ml și se sterilizează la 110° C timp de 20 minute. Mediul neinsămînțat este incolor sau ușor verzui. Dacă devine albastru nu mai poate fi folosit ;

— mediul de transport al probelor recoltate din infecțiile dezenterice : glicerină 300 ml, apă distilată 700 ml ; NaCl — 4,2 g, KH_2PO_4 — 1 g, K_2HPO_4 — 3,1 g, pH = 7,2. Mediul se repartizează cîte 3—5 ml în recipienți de recoltare și se sterilizează la 110°C timp de 30 minute.

Sîngele se recoltează în vederea următoarelor examene : examen bacteriologic indicat ori de cîte ori se cere căutată prezența agentului patogen în circulația generală (febră tifoidă, diverse septicemii, endocardită lentă, bruceloză) ; examenul serologic cînd prezența și titrul anticorpilor specifici în ser ar putea da date asupra naturii agentului

patogen, examen parazitologic în care punerea în evidență a unui parazit duce în unele cazuri la diagnosticarea unei afecțiuni și examenul morfologic.

Recoltarea sîngelui în vederea examenului bacteriologic se face prin puncție venoasă în condiții de asepsie riguroasă : hemocultura. În acest scop se folosește seringa de sticlă numită seringa Louer de 10—20 ml, cu ac de platină sau contraacid (5—6 cm), sterilizate în prealabil la autoclav la 120°C timp de 30 min, într-un tub cilindric de sticlă astupat cu dop de vată, flacoane cu medii de cultură, garou, alcool, tinctură de iod, vată.

Se aplică un garou pentru a realiza o hemostază relativă cu scopul de a face venele mai turgescente și se aseptizează zona pliei cotului cu tinctură de iod sau alcool. Se punctionează vena cît mai rapid și se extrag 10—15 ml sînge (după natura probabilă a infecției) care se însămînțează, în condiții de perfectă sterilitate în flacoane cu medii lichide dinainte pregătite :

— un balonaș cu 200 ml bulion glucozat 1% ;
— un balonaș cu 200 ml bulion-ser ;
— un tub cu 10 ml bulion simplu peptonat ;
— un tub cu 10 ml bulion și lichid de ascită ;
— un tub cu 10 ml bulion-ser + ulei de parafină steril (1 ml).

În laborator, după 24—40 ore, se fac treceri din aceste medii pe geloză înclinată 2%, geloză-ser, geloză ascită, apă peptonată etc. (după caz). Mediile însămînțate sînt incubate la termostat la 37°C timp de 14 zile, observîndu-se zilnic dezvoltarea microorganismelor. Se trece apoi la identificarea microorganismelor într-un timp cît mai scurt și se determină sensibilitatea lor la antibiotice.

La copii, puncția venoasă se practică în vena jugulară sau în sinusul sagital, prin fontanelă. Pentru a reduce riscul contaminării în timpul recoltării și a inoculării sîngelui în mediile de cultură, se atașează direct la balonul cu mediu, acul de puncție venoasă prin intermediul unui tub de cauciuc de circa 10—15 cm lungime. Acest dispozitiv se sterilizează 30 min. la autoclav la 120°C. Atunci cînd este necesară o însămînțare în condiții de anaerobioză, sîngele este inoculat în balonul cu bulion glucozat sau alt mediu anaerob lichid, fiert în prealabil în baie de apă 20 min. și conținînd ulei de parafină steril.

Pentru examenele parazitologice se face un frotiu în picătură groasă astfel : se aseptizează pulpa unui deget, se înțeapă pielea cu un ac de seringă sterilizat în prealabil și se aplică o lamă degresată pentru a prinde într-un triunghi 3 picături de sînge. Se amestecă bine, circular cu colțul unei alte lame, realizîndu-se o picătură mare de aproximativ 1 cm diametru. Se acoperă cu un capac Petri, se lasă să se usuce, se etichetează, se împachetează în hîrtie și se păstrează pentru colorare. În acest fel se recoltează sîngele pentru reacția Kudiske-Steuer în tifosul exantematic sau pentru cercetarea borelliei, febrei recurente etc.

Puroiul format fie la nivelul unui abces rece, fie a unuia banal se prelevă fie direct cu ansa, dacă este o colecție deschisă, fie prin puncție și aspirație, dacă este o colecție închisă. Dacă este în cantitate mare

puroiul se introduce într-o eprubetă sterilă sau o cutie Petri sterilă și se trimite la laboratorul unde se fac însămînțări și frotiuri. Dacă puroiul este în cantitate mică, însămînțarea se face concomitent cu recoltarea. Pipeta Pasteur cu picătura de puroi recoltată se introduce în mediul de cultură, imediat după recoltare.

Aspectul microscopic al puroiului poate da uneori indicații asupra microorganismelor patogene pe care le conține. Aspectul de puroi cremos și consistent este datorat stafilococului, cel grunjos și filant aparține streptococului, altul cu miros fetid indică prezența anaerobilor și unul de culoare albastră-verde indică prezența piocianicului.

Exudatele rino-faringiene folosite pentru purtătorii cronici de meningococ, stafilococ, streptococ hemolitic, bacilul difeteric, cu localizări nazo-faringiene, imediat după recoltare trebuie trimise laboratorului pentru însămînțare în medii de îmbogățire.

Exudatele bronho-pulmonare sînt realizate pentru tuberculoză pulmonară, abcese pulmonare, bronșiectazii și pneumonie. Însămînțările, în acest caz, se fac atît pe medii pentru aerobi cît și pe medii pentru anaerobi.

Materiile fecale se recoltează în vederea examenului bacteriologic, parazitologic și pentru intoxicații de origine alimentară. Obținerea de culturi, în acest caz, și studiul microorganismelor din cultură se numește coprocultură. Se poate evidenția în acest mod agentul patogen al dezinteriei, bacilul tific, și alte microorganisme patogene.

11.4. ÎNSĂMÎNȚAREA MICROORGANISMELOR

Studiul unui microorganism, în vederea identificării și descrierii lui, începe odată cu recoltarea lui fie din natură, fie din diferite produse patologice și continuă cu următoarele etape de cercetare :

— însămînțarea și izolarea microorganismului în cultură pură ;
— studiul caracterelor de cultură și de colonie pe diferite medii de cultură ;
— studiul caracterelor morfologice ;
— studiul caracterelor biochimice ;
— studiul caracterelor serologice ;
— studiul patogenității și al virulenței.

11.4.1. TEHNICI DE ÎNSĂMÎNȚARE

Prin însămînțare se înțelege trecerea unei culturi microbiene sau a unei porțiuni, de obicei foarte reduse, din produsul patogen pe un mediu de cultură favorabil speciei microbiene, în vederea cultivării și a izolării microorganismelor în cultură pură.

Însămînțarea se face în condiții de perfectă asepsie, la flacăra becului de gaz sau în hote sterilizate cu raze ultraviolete, cu ajutorul unor instrumente ca : ansa de platină, pipeta Pasteur, pipeta gradată, tampon de vată etc., în medii lichide, solide sau speciale sterile, pentru a se evita introducerea în mediu a altor microorganisme decît cele prezente în produsul de însămînțat.

Pentru realizarea condițiilor de asepsie, însămînțarea se face în încăperi lipsite de curenți de aer (sau chiar în boxe sterile), persoana nu vorbește, poartă bonetă, eventual și mască.

Ansa cu care se realizează însămînțarea trebuie sterilizată atît înainte, cît și după această operație. Pipetele Pasteur sau cele gradate folosite în același scop, se flambează înainte de însămînțare, iar după aceea sînt introduse într-un vas cu amestec oxidant aflat pe masa de lucru. După flambare, ansa și pipetele se lasă cîteva secunde să se răcească, înainte de a le folosi la însămînțare, deoarece temperatura ridicată distruge microorganismele.

Deschiderea recipientelor în care sînt repartizate mediile de cultură ce urmează a fi însămînțate se face cu mare atenție, în apropierea flăcării becului de gaz și se flambează gura acestora.

Prin însămînțare simplă se obține în general o creștere masivă bacteriană pe mediul de cultură. Cel mai adesea, însămînțarea se face în anumite condiții, pentru a realiza, în același timp, atît creșterea bacteriilor cît și izolarea lor sub formă de colonii bine individualizate.

În funcție de scopul urmărit există mai multe tehnici de însămînțare a microorganismelor, atît în medii de cultură lichide cît și în medii de cultură solide. Indiferent de tehnica folosită și de natura mediului de cultură utilizat pentru a fi însămînțate, operațiunile de însămînțare sînt următoarele :

— instrumentul cu care se face însămînțarea se ține în mîna dreaptă și se sterilizează la flacără. Ansa se ține în poziție cît mai verticală în vîrful flăcării becului de gaz și se sterilizează prin încălzire la roșu ; după care se flambează pe toată lungimea ei. Pipetele (Pasteur și gradate) se țin între degetul mare și cel mijlociu cu arătătorul aplicat pe orificiul astupat cu vată ;

— recipientele (eprubete, baloane Erlermayer, plăci Petri) în care urmează a fi introdus microorganismul, se țin de extremitatea inferioară în mîna stîngă în așa fel încît să poată fi controlat cu vederea permanent modul în care se realizează însămînțarea ;

— după sterilizarea instrumentelor se scoate dopul recipientului, cuprinzîndu-l între degetul mic și palma mîinii drepte. Cît timp recipientele sînt fără dop se mențin înclinate lîngă becul de gaz, pentru a evita pătrunderea particolelor de praf din atmosferă. Se flambează gura recipientului ;

— se introduce instrumentul și se recoltează din produsul ce urmează a fi însămînțat după care se scoate cu grijă pentru a evita atingerea pereților și mai ales a gurii și a gîtului recipientului. Se flambează și se astupă cu dopuri de vată ;

— se lasă pe masă recipientul cu produsul, se ia tot în mîna stîngă recipientul cu mediul de cultură ce urmează a fi însămînțat deschizîndu-l în același mod ;

— se depune produsul de însămînțat în recipientul steril, se scoate instrumentul cu aceeași atenție, se flambează gîtul sau gura acestuia și se astupă cu dopul de vată ;

— după terminarea operației de însămînțare, ansa se sterilizează prin încălzire pînă la roșu, cu deosebirea că la început cînd ansa este

încărcată cu produs, sterilizarea se realizează la baza vîrfului și nu în vîrful flăcării unde căldura este mai puternică, pentru a evita contaminarea cu stropi ce ar putea să sară în cursul operației. Pipetele nu se lasă niciodată pe masă, imediat după însămînțare se introduc în vasul cu amestec sulfo-oxidant aflat pe masa de lucru ;

— după însămînțare recipientele sînt notate cu numele culturii microbiene sau al produsului patologic și cu data însămînțării, după care sînt puse la termostat la temperatura optimă dezvoltării bacteriilor.

11.4.1.1. Tehnica însămînțării în medii lichide

Mediile de cultură lichide pot fi însămînțate fie dintr-o cultură microbiană în mediul lichid sau dintr-un alt mediu lichid : apă, sol, lapte, produs patologic lichid (urină, spută etc.) fie dintr-o cultură microbiană pe mediu solid sau un produs patologic solid.

Însămînțarea unui mediu lichid dintr-o cultură microbiană în mediu lichid.

Materiale necesare :

— produsul de însămînțat reprezentat de o cultură în mediu lichid ;
— mediul de cultură lichid ce urmează a fi însămînțat, sterilizat în prealabil și repartizat în mod steril în eprubete sterile ;
— pipete Pasteur sau pipete gradate sterile ;
— bec de gaz ;
— vas cu amestec sulfo-oxidant ;
— creion dermatograf.

Însămînțarea mediului lichid dintr-o cultură în mediul lichid se face cu pipeta Pasteur, atunci cînd avem de însămînțat o cantitate oarecare, și cu pipeta gradată atunci cînd avem de însămînțat o cantitate fixă.

Tehnica de lucru

Se sterilizează pipeta Pasteur sau pipeta gradată prin flambare și se introduce în mod steril în recipientul cu produsul de însămînțat. Se aspiră din cultura respectivă, se scoate cu atenție pipeta și se introduce în mod steril în eprubeta cu mediul de cultură. Se lasă să curgă cîteva picături din pipeta Pasteur sau toată cantitatea aspirată în pipeta gradată, se scoate pipeta, se flambează gîtul eprubetei și se astupă cu dop de vată. Se rotește eprubeta în palmă pentru omogenizare suspensiei, se notează numele culturii, data însămînțării, se pune în cutii de tablă și se incubează la termostat.

Însămînțarea unui mediu lichid dintr-o cultură în mediu solid.

Instrumentul folosit în acest caz este ansa.

Materiale necesare

— produsul de însămînțat — cultura în mediu solid ;
— tuburi cu mediul lichid ce urmeaază a fi însămînțat ;
— ansă ;
— bec de gaz ;
— creion dermatograf.

Tehnica de lucru

Operațiile de însămînțare sînt cele descrise anterior, cu deosebire că în acest caz ansa încărcată cu produs se introduce steril în tubul cu mediu lichid, pînă la suprafața lichidului, fără a intra în el. Produsul recoltat este depus pe peretele tubului și apoi este suspendat și omogenizat în mediu cu ajutorul ansei. La fel, tuburile se notează cu numele culturii și data însămînțării și se pun la termostat.

11.4.1.2. Însămînțarea unui mediu de cultură solid

Înainte de însămînțare, mediul de cultură solid este pus în baia de apă pentru lichefiere, în vederea repartizării în vase de cultură. Repartizarea se face atunci cînd mediul este încă fierbinte (45°—50°C) în mod steril, lîngă becul de gaz și în recipiente sterile. În acest scop se folosesc tuburi sau plăci Petri de diferite diametre. După repartizare, mediul se lasă la temperatura camerei pentru solidificare, urmînd a fi însămînțat. Solidificarea mediului se poate realiza drept, înclinat sau în plăci Petri, în funcție de scopul însămînțării.

Însămînțarea mediilor solide se poate face fie dintr-o cultură în mediu lichid, fie dintr-o cultură în mediu solid. Însămînțarea unui material lichid în mediu solid se face fie cu pipeta Pasteur, fie cu ansa. Pentru aceasta se ia o picătură din produsul microbian, respectînd condițiile de asepsie, care se disemineză pe suprafața mediului de cultură solid.

Însămînțarea pe mediu solidificat înclinat în tuburi

Această tehnică poartă numele de tehnica însămînțării în striuri în zig-zag.

Materiale necesare

— produsul de însămînțat reprezentat de o cultură pe mediul solid ;
— tuburi cu mediu solid (geloză) înclinat ;
— ansă ;
— bec de gaz ;
— creion dermatograf.

Tehnica de lucru

După ce ansa a fost încărcată cu produsul ce urmează a fi însămînțat, se introduce în mod steril, după modul descris anterior în tubul de geloză înclinată pînă la fundul tubului, unde atunci cînd mediul este proaspăt turnat, există o picătură de lichid de condensare rezultată în urma solidificării mediului. Se omogenizează conținutul ansei în picătura de lichid de condensare (Fig. 254) și apoi se trasează cu ansa striuri în zig-zag pe suprafața gelozei cu atenție, fără a pătrunde în mediu. Tubul cu mediul însămînțat se notează și se incubează la termostat.

Prin această tehnică de însămînțare se poate determina una din caracteristicile microorganismelor — mobilitatea.

Microorganismele care se dezvoltă exact pe striurile de însămînțare aparțin microorganismelor imobile, lipsite de flageli, iar cele care se vor dezvolta pe toată suprafața gelozei, deși însămînțarea s-a făcut în striuri aparțin microorganismelor mobile.

În cazul în care produsul de însămînțat este reprezentat de o cultură în mediul lichid, însămînțarea pe geloză înclinată se poate realiza în două moduri, în funcție de bogăția în germeni a produsului.

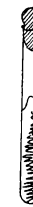


Fig. 254. Însămînțarea în striuri în zig-zag pe geloză înclinată.

Dacă produsul este mai sărac în microorganisme, atunci însămînțarea pe geloză se face cu pipeta Pasteur, în striuri în zig-zag. Dacă produsul este bogat în microorganisme, însămînțarea se face cu ansa în striuri în zig-zag.

Însămînțarea în mediu solid repartizat drept (geloză dreaptă) se face în profunzime prin înțepătură (Fig. 255) sau cu pipeta Pasteur.

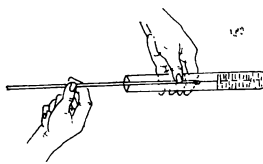


Fig. 255. Însămînțarea prin înțepare.

Însămînțarea în mediu solid repartizat în plăci Petri se face prin mai multe tehnici, în funcție de scopul urmărit, dintre care amintim pe cele mai importante: tehnica însămînțării în pînză, și tehnicile de izolare în cultură pură.

Tehnica însămînțării în pînză

Această tehnică este folosită curent pentru obținerea de masă celulară, pentru cultivarea bacteriofagilor, realizarea antibiogramei, izolarea tulpinilor înalt producătoare de antibiotice etc.

Materiale necesare

— plăci cu geloză turnată în prealabil;
— suspensii test dese de microorganisme;
— pipete gradate sterile;
— vas cu amestec sulfooxidant;

— bec de gaz ;
— creion dermatograf.

Tehnica de lucru

Se face o suspensie bacteriană în apă fiziologică sterilă după tehnica însămînțării în mediul lichid, din care se aspiră în mod steril 3—5 ml cu pipeta gradată. Se ridică ușor capacul plăcii Petri, aflată lîngă becul de gaz, și se lasă să curgă toată cantitatea de suspensie aspirată. Se pune capacul și se rotește placa pe masă pentru repartizarea uniformă și omogenizarea suspensiei pe toată suprafața gelozei. Se înclină apoi ușor placa, și se scoate cu aceeași pipetă surplusul de suspensie care se aruncă în vasul cu amestec oxidant. Se pune capacul plăcii și pipeta se introduce în dezinfectant. Placa astfel însămînțată se notează pe capac și se incubează termostat.

11.5. TEHNICI DE IZOLARE A MICROORGANISMELOR ÎN CULTURĂ PURĂ

Condiția esențială pentru a studia și identifica un microorganism este izolarea acestuia în cultură pură. Obținerea unei culturi pure este posibilă prin transferul unei colonii izolate obținute pe mediu solid prin diverse tehnici de însămînțare. Din colonia obținută se însămînțează pe medii de cultură lichide și solide pentru teste microscopice, morfologice, tinctoriale și culturale care confirmă puritatea culturii. Microorganismele obținute în cultură pură trebuie menținute pe medii de cultură fie pentru a le studia, fie penrtu a fi incluse în colecție. Pentru perioade mai scurte de timp, menținerea unei culturi pure se realizează prin pasaje repetate periodic pe medii proaspete. Pentru conservarea pe perioade mai lungi se folosește cel mai adesea liofilizarea și parafinarea culturii, respectiv.

11.5.1. TEHNICA SĂRĂCIRII SAU EPUIZĂRII ANSEI

Materiale necesare

— suspensii foarte diluate în apă fiziologică sterilă din cultura mixtă pe care dorim să o purificăm ;
— plăci cu geloză turnată din ajun ;
— ansă ;
— bec de gaz ;
— creion dermatograf.

Tehnica de lucru

Se introduce ansa în mod steril, în suspensia foarte diluată din cultura mixtă, suspensie obținută în apă fiziologică sterilă din cultura mixtă pe care dorim să o purificăm.

Ansa încărcată cu produsul respectiv se descarcă succesiv pînă la epuizare pe suprafața mediului solid repartizat în plăci Petri, de obicei prin striuri paralele. Aceste striuri paralele pot fi trasate în mai multe moduri, conform figurii 256.

Prin această metodă, ansa se șterge pe mediu, pe un drum lung, în așa fel încît la sfîrșit ea este atît de săracită că lasă microorganismele la distanță unul de altul, obținîndu-se astfel colonii izolate, de microorganisme în stare pură.

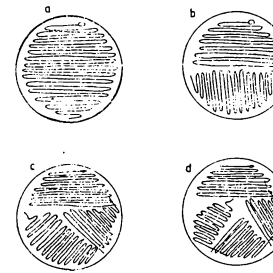


Fig. 256. Tehnica săracirii sau epuizării ansei.

De exemplu : dacă avem o cultură mixtă formată din două microorganisme, unul care formează colonii roșii și altul ce formează colonii verzi, atunci în urma însămînțării prin această tehnică vom obține pe primele striuri de însămînțare colonii amestecate ale ambelor tipuri de microorganisme. Pe măsură ce ansa înaintează, ea va fi atît de săracită, încît pe ultimele striuri va lăsa din loc în loc microorganisme ce vor forma colonii roșii și microorganisme ce vor forma colonii verzi. Dacă pe noi ne interesează microorganismele care formează colonii roșii, vom recolta din această colonie dezvoltată după incubarea la termostat și vom însămînța pe geloză înclinată, obținînd astfel microorganismul respectiv în cultură pură.

11.5.2. TEHNICA ÎNSĂMÎNȚĂRII DILUȚIILOR ZECIMALE PRIN ÎNCORPORARE

Această tehnică este folosită atunci cînd microorganismul care trebuie izolat în cultură pură este asociat cu un număr mare de alte specii de microorganisme. De exemplu, această tehnică este folosită pentru izolarea microorganismelor din medii naturale : apă, sol, lapte care sînt foarte bogate în microorganisme.

Materiale necesare

— produsul de însămînțat — reprezentat de o probă de sol ;
— eprubete sterile ;
— apă fiziologică sterilă ;
— pipete gradate sterile ;
— plăci Petri sterile ;
— tuburi cu geloză dreaptă ;
— baie de apă ;
— creion dermatograf ;

— bec de gaz ;
— vas cu amestec oxidant.

Tehnica de lucru

Produsul care conține microorganismul, în cazul de față solul se cîntărește (10 g), se mojarează și se diluează în apă fiziologică sterilă, după un anumit coeficent de diluare egal cu 10. Se obține astfel o serie de diluții succesive în care numărul celulelor scade în progresie geometrică. Pentru obținerea diluțiilor, în fiecare eprubetă se repartizează în mod steril cîte 9 ml apă fiziologică sterilă. Se ia apoi 1 ml din suspensia inițială (solul mojarat în apă sterilă) și se introduce în prima eprubetă, unde se realizează diluția de 10^{-1} (1/10). Se barbotează cu ajutorul pipetei pentru omogenizarea suspensiei, se scoate 1 ml cu aceeași pipetă și se introduce în a doua eprubetă unde se realizează diluția 10^{-2} (1/100). În același mod se pregătesc și diluțiile următoare de 10^{-3} (1/1000), 10^{-4} (1/10.000) ș.a.m.d. Numărul diluțiilor variază în funcție de bogăția în germeni a produsului inițial. Diluțiile obținute sînt notate pe fiecare tub în parte. Din ultimele tuburi de diluție se fac însămînțări în plăci Petri sterile. Însămînțarea se face cu pipeta ; luînd cîte 1 ml și depunîndu-l sub formă de picături din loc în loc pe fundul unei plăci Petri sterile (Fig. 257).

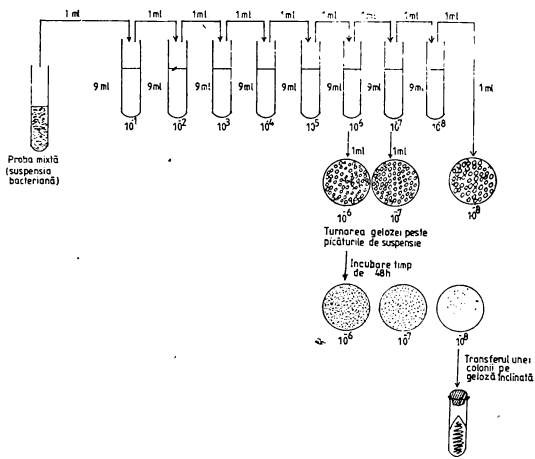


Fig. 257. Tehnica însămînțării diluțiilor prin încorporare.

Între timp, tuburile cu geloză dreaptă se pun în baia de apă pe foc, pentru lichefiere. După lichefiere și răcire la 45—47°, geloza se toarnă steril în placă, peste picături (încorporarea diluțiilor) și placa se lasă pe masă pînă ce se solidifică geloza. Se notează pe capac, cu numele produsului, diluția din care s-a însămînțat și data însămînțării. După 48 ore de incubare la termostat se obțin în unele plăci Petri colonii izolate, distanțate între ele, care denotă izolarea în cultură pură a speciei sau a speciilor microbiene din produsul respectiv.

O altă tehnică a diluțiilor succesive se poate realiza în felul următor: o porțiune din produsul patologic se diluează în bulion, apă peptonată sau gelatină lichefiată, cu o pipetă Pasteur sau cu ansă, atunci cînd produsul patologic este lichid. Se lasă să curgă o picătură din bucla ansei într-un tub cu mediu. Din acest tub însămînțat se trece tot o picătură în al doilea tub, după care se repetă operația diluției în 6—8 tuburi succesive.

Dacă în produsul patologic au existat două specii microbiene, un coc și un bacil, atunci după un număr de diluții succesive va avea loc creșterea în tuburi separate a cocilor și bacililor.

Acestea sînt tehnicile cel mai des utilizate în laboratorul de microbiologie pentru însămînțarea microorganismelor și izolarea unui microorganism în cultură pură.

Pe lîngă acestea mai există o serie de metode speciale de izolare a microorganismelor, care permit totodată și indentificarea speciei microbiene izolate, deoarece evidențiază anumite caractere metabolice. Alte categorii de metode se bazează pe izolarea microorganismelor în funcție de particularitățile de comportare a bacteriilor față de agenți fizici, chimici și biologici, folosite în special în cazul enterobacteriilor, a bacilului tuberculozei *(Mycobacterium tuberculosis)*, a pneumococului *(Streptococcus pneumoniae)*, a stafilococului, a clostridiilor, și a altor microorganisme patogene.

Indiferent de tehnica de însămînțare folosită trebuie ținut cont de tipul respirator al microorganismului ce urmează a fi cultivat (aerob, anaerob, facultativ anaerob). Tehnicile descrise sînt folsite pentru cultivarea microorganismelor aerobe. Pentru bacteriile anaerobe se folosesc tehnici speciale de izolare, care fie necesită o apartură specială, fie se bazează pe crearea condițiilor de anaerobioză în vasele de cultură care sînt utilizate în acest scop.

11.6. INCUBAREA ȘI CONSERVAREA MICROORGANISMELOR

După însămînțare, mediile nutritive sînt incubate la termostat, timp variabil, pentru ca microorganismele să se poată dezvolta. Încubarea microorganismelor are loc la temperaturi optime, care să favorizeze metabolismul microorganismelor respective și ca urmare creșterea și multiplicarea lor. Incubarea bacteriilor se face în aparate speciale numite termostate sau incubatoare prevăzute cu termometre de contact, care permit reglarea temperaturii. Cele mai moderne termostate asigură reglarea temperaturii la valori cuprinse între 0°—100°C și sînt echipate cu aparate de răcire pînă la —10°C. În interior au rafturi, pe care se așează recipientele inoculate cu diferite microorganisme. În

general temperatura optimă de incubare a bacteriilor mezofile este de 30°C, temperatura optimă a bacteriilor patogene este de 37°C, iar a bacteriilor termofile de 50°C.

În timpul incubării, tuburile cu mediul însămînțat sînt puse pe rafturi în coșuri sau în cutii de tablă îmbrăcate în hîrtie și prevăzute cu vată în interior, iar plăcile Petri se așează în poziție inversă (cu capacul în jos).

După dezvoltarea coloniilor bacteriene, se recoltează în mod steril, cu ansa din colonia care ne interesează și se transferă pe mediul agarizat înclinat pentru obținerea unei culturi pure, cultură care este trecută în colecție sau folsită în experiențe de laborator.

Menținerea și conservarea culturilor pure

Problema microorganismelor selecționate cu păstrarea capacităților metabolice în timp este de mare actualitate și de foarte mare importanță.

Nu există încă o metodă de conservare unanim acceptată care să se aplice tuturor microorganismelor.

Conservarea care se practică în momentul de față, constă în realizarea de pasaje succesive (treceri repetate) pe medii de cultură optime. Bacteriile se trec la interval de cîteva luni pe geloză înclinată și se păstrează la frigider, după dezvoltarea culturii.

O altă metodă de conservare care se aplică bacteriilor, în special, dar și drojdiilor și algelor, este conservarea sub ulei de parafină. Culturile obținute după însămînțarea pe un mediu de cultură solid, aflate în faza de creștere logaritmică pentru microorganismele nesporulate sau în faza sporulată abundent, pentru microorganismele sporulate, se acoperă steril cu un strat de ulei de parafină (circa 2 ml ulei de parafină per tub de cutlură). Acesta are rolul de a împiedica evaporarea apei din mediu și ca urmare variațiile de presiune osmotică, care sînt dăunătoare pentru microorganisme. Culturile astfel pregătite pot fi conservate în această stare mai mulți ani, fără să-și piardă proprietățile.

Liofilizarea — este o altă metodă de conservare, care constă în răcirea rapidă a culturii bacteriene la —20°C, urmată de o uscare în vid și închiderea fiolelor de sticlă în vid. Prin această metodă, un număr mare de celule mor. Procentul de celule care supraviețuiesc (5—30%) este suficient pentru a iniția o cultură microbiană, atunci cînd fiola se taie, se adaugă liofilizatului apă fiziologică sterilă și se trece suspensia pe un mediu de cultură adecvat. Culturile liofilizate se păstrează tot la frigider timp de unu pînă la douăzeci de ani.

Indiferent de metoda de conservare folosită atunci cînd se lucrează cu o tulpină conservată, aceasta se trece pe mediul adecvat și după 24—28 ore de incubare se testează sub raportul viabilității.

11.7. EXAMINAREA CULTURILOR ȘI AL COLONIILOR BACTERIENE

Creșterea și multiplicarea bacteriilor pe diferite medii de cultură îmbracă aspecte foarte variate, care pot reprezenta caractere de identificare a multor specii bacteriene. Ca urmare, studiul caracterelor de cultură și de colonie reprezintă o primă etapă în descrierea și identificarea unei bacterii.

Cultura bacteriană reprezintă totalitatea celulelor dezvoltate dintr-un inocul pe un mediu de cultură lichid sau solid. Cultura bacteriană poate fi pură (formată dintr-o singură specie) sau impură. Cultura provine de obicei, din confluarea mai multor colonii bacteriene și se întinde pe o arie mult mai largă.

Colonia bacteriană reprezintă totalitatea descendenților unuia sau mai multor celule care aparțin aceleiași specii bacteriene și care se dezvoltă numai în medii solide. Colonia se dezvoltă pe o arie limitată, de obicei circulară.

Aspectul culturilor este caracteristic pentru o specie dată, fiind același pe un anumit mediu, în anumite condiții.

Caracterele de cultură privind aspectul macroscopic al culturiior se studiază în medii lichide și solide, în fiecare zi, odată sau de mai multe ori pe zi, notînd de fiecare dată aspectul culturii. Ca mediu de cultură lichid poate fi folosit bulionul nutritiv repartizat în tuburi, iar ca mediu solid poate fi folosită geloza repartizată în tuburi înclinate sau în plăci Petri.

În medii de cultură lichide se notează momentul apariției culturii demonstrat de o tulbureală a mediului, după care se notează următoarele aspecte :

a) — gradul de tulburare a mediului :

— intens tulbure sau mai slab, omogen sau neomogen, floculer sau precipitat ;

b) — prezența sau absența membranei la suprafața lichidului. Aspectul membranei atunci cînd este prezentă : peliculă (văl) subțire sau groasă ; netedă sau încrețită ; umedă sau uscată ; aderentă la pereții tubului ; rezistentă la agitări sau fiabilă ; formează unul sau mai multe inele pe peretele tubului.

c) — prezența sau absența depozitului. Aspectul acestuia atunci cînd se dezvoltă : abundent sau sărac, granular, viscos, floculer, se poate aduce ușor sau nu în suspensii prin agitare (fig. 258).

d) — mirosul culturii. Fiecare specie microbiană are un miros caracteristic de putrefacție, aromatic, de acid sau astringent, care îi permite identificarea alături de alte caractere morfologice și biochimice.

e) — culoarea culturii — este dată de felul pigmentului produs de microorganism și de localizarea lui. În medii lichide sînt evidențiate numai microorganismele care formează pigment și îl eliberează în mediu, colorîndu-l.

Staphylococcus aureus tulbură uniform mediul, *Escherichia coli* tulbură bulionul cu formare de unde mătăsoase. *Streptococcus* și *Bacillus anthracis* tulbură mediul și formează un depozit floculer. *Streptococcus faecalis* formează un depozit viscos.

Unele specii care nu tulbură mediul formează o peliculă sau un văl subțire și fragil la suprafața mediului cum este cazul lui *Corynebacterium dyphteriae,* sau compact și plisat *(Bacillus subtilis)* sau viscos *(Pseudomonas aeruginosa). Klebsiella pneumoniae* formează la suprafața mediului un inel.

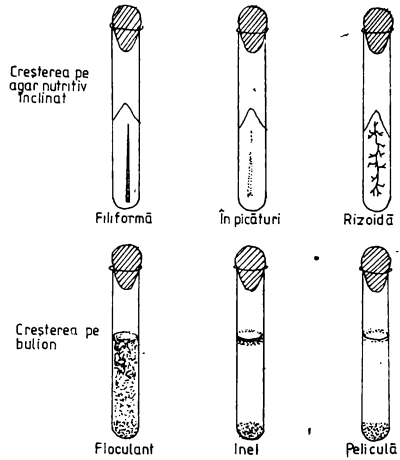


Fig. 258. Caracterele culturale ale bacteriilor.

După aspectul și modul în care bacteriile se dezvoltă în mediul lichid (bulion nutritiv) repartizat în tuburi, se poate evidenția tipul respirator al microorganismului cultivat, stabilindu-se dacă microorganismul este aerob, anaerob, facultativ anaerob sau microaerofil (Fig. 259).

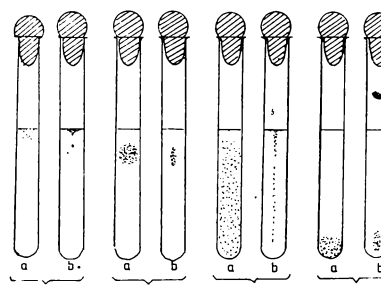


Fig. 259. Tipuri respiratorii la microorganisme.

Însămînțate pe geloză înclinată, microorganismele dau două tipuri de culturi caracterizate după aspectul striurilor de însămînțare :

— culturi de tip „H" (hauch = văl în limba gremană), care după însămînțarea în striuri în zig-zag se întind pe toată suprafața gelozei înclinate. Au suprafața netedă, cutată lucioasă. Sînt culturi ce aparțin microorganismelor mobile (majoritatea bacililor).

— culturi de tip „O" (ohne hauch = fără văl), care se dezvoltă exact pe striurile de însămînțare și care aparțin microorganismelor imobile (cocii)).

Culoarea culturii pe medii solide evidențiază atît microorganismele care formează pigment și îl eliberează în mediu, cît și microorganismele care formează pigment cu localizare în peretele celular sau în capsulă. Mirosul culturii este același ca și în mediile lichide.

Examentul caracterelor de cultură poate fi realizat în laborator prin însămînțarea în bulion nutritiv și pe geloză înclinată a celor mai cunoscute specii bacteriene *(Bacillus subtilis, Sarcina sp., Escherichia coli, Bacillus cereus, Azobacter sp.* etc).

Examenul coloniilor bacteriene

Forma, structura, dimensiunile coloniilor bacteriene sînt determinate de morfologia celulelor, de modul lor de grupare caracteristic, precum și de diferiți factori fizici și chimici din mediu.

Examenul coloniilor se face pe geloză în plăci, pe care s-au obținut colonii izolate prin diferite tehnici de însămînțare. Și în acest caz se notează momentul apariției coloniei, după care se notează următoarele aspecte (Fig. 250) ;

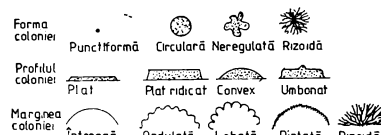


Fig. 260. Caractere de colonie.

a) — dimensiunile coloniei (mai puțin de 1 mm în diametru).

b) — forma coloniei : punctiformă, circulară, neregulată, filamentoasă, rizoidă.

c) — marginile coloniei : drepte, ondulate, lobate, dințate.

d) — profilul coloniei : plat, ridicat, convex.

f) — transparența sau opacitatea coloniei.

e) — suprafața coloniei : netedă, uscată, umedă, încrețită, rugoasă.

După aspectul morfologic, au fost descrise la bacterii două tipuri principale de colonii :

— Colonii „S" (smooth = neted) și colonii „R" (rough = rugos).

Coloniile de tip „S" sînt colonii de formă punctiformă sau circulară, cu marginile întregi drepte. Privite din profil, aceste colonii apar mai mult sau mai puțin bombate, cu suprafața netedă, lucioasă. Emulsionează

ușor în apă fiziologică, dînd suspensii omogene și stabile. Se desprind ușor de pe substrat. Tulbură uniform bulionul. Microorganismele patogene care formează colonii de tip „S" sînt foarte virulente, avînd o patogenitate maximă.

Coloniile de tip „R" sînt colonii de formă neregulată, filamentoasă sau rizoidă, cu marginile neregulate, dințate sau lobate. Suprafața este încrețită, rugoasă, iar profilul este plat, turtit. Sînt aderente de substrat. În apă fiziologică dau suspensii neomogene și instabile. Formează grunji care se depun. În bulion se dezvoltă greu, formînd sediment. În cazul microorganismelor patogene coloniile de tip „R" sînt avirulente sau slab virulente, fiind foarte sensibile la fagocitoză.

Bacteriile anaerobe, cultivate în profunzimea mediilor solide, pot forma trei tipuri de colonii profunde: lenticulare biconvexe *(Clostridium perfigens)*, pufoase *(Clostridium sporogenes)* și arborescente *(Clostridium septicum)*.

Examenul coloniilor în laborator poate fi realizat în felul următor: o placă în care s-a repartizat geloză se lasă deschisă, în contact cu aerul cîteva ore, după care se aplică capacul și se incubează la termostat 24—48 h. Pe suprafața gelozei se vor dezvolta colonii ale diferitelor microorganisme din aer, care au aspect caracteristic, aparținînd ambelor tipuri „S" și „R". Aceste colonii pot fi examinate la lupă.

Culturile de microorganisme necesare unui laborator de microbiologie pot fi procurate din colecțiile Institutului „Dr. I. Cantacuzino", unitățile Institutului Central de Biologie, Facultatea de Biologie—Geografie—Geologie, laboratoarele spitalelor județene și de la alte unități de profil.

11.8. TEHNICI DE MICROSCOPIE — MICROSCOPUL CU IMERSIE

Datorită dimensiunilor mici, submicroscopice (în medie 0,5—1 μm × 3—6 μm), bacteriile au fost evidențiate relativ tîrziu, o dată cu perfecționarea mijloacelor optice de urmărire. Descrierea constituenților structurali ai celulei bacteriene a fost posibilă datorită modernizării și diversificării mijloacelor de studiu și în special a tehnicilor de citochimie și a celor de microscopie electronică.

Pe baza studiilor efectuate, bacteriile au fost încadrate într-un regn aparte — regnul Monera — reprezentînd o lume aparte, cu un statut de independență în natură, fără echivalent în lumea vie. Bacteriile sînt organisme unicelulare, de tip procariot, cu existență unicelular-solitară sau unicelular-colonială. Celula procariotă, mai puțin complexă este unitatea de structură și funcție a bacteriilor și a bacteriilor albastre-verzi — cianobacterii. Este delimitată la exterior de un perete celular bine definit structural și de consistență rigidă. Situat în afara membranei plasmatice, el este acoperit la unele specii de o capsulă sau nu strat mucos pericelular, iar la bacteriile mobile este străbătut de flagel — organul de locomoție al bacteriilor.

În funcție de structură și compoziție chimică, pereții celulari ai bacteriilor corespund la trei categorii care coincid cu modul lor de colorare Gram pozitiv, Gram negativ, acido-rezistent.

Luînd ca reper peretele celular, constituenții celulei bacteriene pot fi grupați în două mari categorii ;

a) — intraparietali — care formează protoplastul bacterian (membrana plasmatică, mezosomii, citoplasma, ribosomii, nucleoidul, sporul, incluziile, vacuolele, aparatul fotosintetic) ;

b) — extraparietale (capsula, stratul mucos, glicocalixul, flagelii, pilii și fimbriile).

Constituenții intra- și extraparietali pot fi observați cu ajutorul microscoapelor, care sînt de mai multe tipuri și anume : microscopul optic, microscopul cu imersie, microscopul cu fluorescență, microscopul cu contrast de fază, microscopul cu fond negru, microscopul electronic.

Dintre acestea, cel mai frecvent utilizat în laborator este microscopul optic și microscopul cu imersie.

Microscopul cu imersie este un microscop obișnuit fotonic, prevăzut cu un obiectiv special, numit obiectiv de imersie. Acest obiectiv diferă de celelalte obiective ale microscopului, numite obiective uscate, prin natura mediului interpus între lentila frontală a obiectivului și obiectiul de examinat. În cazul obiectivelor uscate, mediul interpus este aerul, al cărui indice de refracție (n = 1) este diferit de cel al sticlei (n = 1,5). În cazul obiectivelor de imersie mediul interpus este un lichid numit ulei de imersie sau ulei de cedru, care are indicele de refracție apropiat de cel al sticlei (n = 1,515). Obiectivul de imersie are puterea de mărire cea mai mare, este notat cu 90x 110x și prezintă, cel mai adesea, un cerc negru de jur împrejur, pentru a putea fi identificat cu ușurință.

Uleiul de imersie, avînd același indice de refracție ca al sticlei transformă întreg spațiul dintre lentila frontală a obiectivului și lama port-obiect într-un spațiu omogen din punctul de vedere al indicelui de refracție. Ca urmare, numeroasele raze de lumină mai oblice, care fără lichid de imersie s-ar pierde prin refracție sau reflexie totală, în prezența acestuia ajung în totalitate în obiectiv, creînd o imagine bună a obiectului de cercetat.

Avantajul obiectivelor de imersie este acela că suprimă sau evită refracția razelor de lumină participînd la obținerea unei luminozități mai mari a preparatului.

În cazul obiectivelor uscate, razele luminoase de o anumită înclinare suferă o reflexie totală atunci cînd ies din lama de sticlă în aer și ca urmare nu pot fi folosite la examenul microscopic al frotiurilor bacteriene. Bacteriile în stare vie pot fi examinate la microscopul optic (fotonic), în acest caz evidențiindu-se numai forma și eventuala mobilitate a acestora. În cazul structurilor intra- și extraparietale, examenul miscroscopic al acestora poate fi realizat numai cu ajutorul microscopului cu imersie, care după cum am mai menționat, creează o imagine mărită bine luminată a obiectului de cercetat.

Modul de lucru la microscopul cu imersie

1. Stabilirea sursei de lumină ;

2. centrarea luminii în funcție de intensitatea ei ;

3. ridicarea condensatorului în poziție maximă sub platina microscopului ;

4. ridicarea tubului microscopului cu ajutorul macrovizei pînă la o distanță de 1—3 cm;

5. aducerea obiectivului de imersie în axul optic al microscopului;

6. montarea preparatului de examinat pe platina microscopului și fixarea lui cu ajutorul celor doi cavaleri;

7. aplicarea unei picături de ulei de cedru pe suprafața preparatului;

8. coborîrea tubului microscopului cu ajutorul macrovizei pînă ce, privind din lateral, lentila frontală a obiectivului ajunge în contact cu picătura de ulei de cedru;

9. din acest moment, privind prin ocular se continuă coborîrea tubului microscopului pînă la obținerea unei imagini;

10. clarificarea imaginii se va face cu viza micrometrică.

După terminarea examenului se ridică tubul microscopului cu ajutorul macrovizei și numai atunci se scoate lama de pe platină pentru a nu zgîria lentila frontală. Uleiul de cedru de pe obiectivul cu imersie se va șterge cu pulpa degetului, iar microscopul se va pune la adăpost de praf fie sub husă, fie în cutie.

Uleiul de cedru poate fi înlocuit cu următoarele lichide:

— uleiul de parafină (n = 1,47) care ca atare dă imagini proaste. Poate fi ameliorat amestecînd 7 părți ulei și 24 părți bromonaftalină;

— uleiul de ricină (n = 1,48) dă imagini ceva mai bune decît precedentul. Rezultate bune se obține cu un amestec conținînd 7—8 părți ulei de ricină și 2—3 părți benzoat de benzil. Se agită 10 minute, se lasă 6 ore la 37°C, se mai agită 5 minute și se păstrează la temperatura camerei;

— glicerina pură de 30° amestecată cu un volum exact de apă distilată;

— amidonul (n = 1,52) dă imagini bune, nu decolorează preparatul, se evaporă lent. Dezavantaj: este mai volatil și mai fluid ca uleiul de cedru.

11.9. EXAMENUL MICROSCOPIC AL BACTERIILOR

În vederea examenului microscopic, bacteriile pot fi examinate în stare vie, într-o suspensie, realizînd un preparat umed între lamă și lamelă și pe frotiuri fixate și colorate după diferite tehnici.

11.9.1. EXAMENUL MICROSCOPIC AL BACTERIILOR ÎN STARE VIE

Se face în scopul evidențierii prezenței acestora și a mobilității lor. Mobilitatea bacteriilor se datorește flagelilor bacterieni și reprezintă un caracter care servește la identificarea unei bacterii alături de alte caractere ca: morfologice, tinctoriale, culturale, biochimice, serologice, patologice. Microorganismele mobile sînt reprezentate de unii bacili, spirili, leptospire și spirochete.

Pentru examenul bacteriilor în stare vie se folosește așa numitul preparat umed între lamă și lamelă.

Materialele necesare realizării unui preparat umed între lamă și lamelă:

— cultura bacteriană în mediu lichid, infuzie de fîn, infuzii de in, suspensii de boabe de fasole în apă de robinet în vîrstă de 24 ore, suspensii în apă fiziologică dintr-o cultură pe geloză ;
— lame, lamele curate și degresate ;
— pipete Pasteur ;
— bec de gaz ;
— vas cu amestec sulfo-cromic.

Tehnica de lucru

Se ia pipeta Pasteur, se sterilizează prin flambare și se introduce în suspensia bacteriană, în mod steril. Se depune o picătură pe lama de sticlă curată și degresată, care apoi se acoperă cu lamela în așa fel încît să nu se formeze bule de aer care să împiedice examinarea la microscop. Dacă picătura de lichid este prea mică și lamela nu o cuprinde, se repetă realizarea preparatului, deoarece în acest caz examenul microscopic este limitat. Dacă picătura este prea mare, lichidul depășind marginile lamelei, atunci surplusul din jurul lamelei se îndepărtează cu hîrtie de filtru. Preparatul astfel realizat se montează pe platina microscopului și examenul se face cu obiectivul uscat cel mai mare (40x) care se apropie foarte mult de lamelă. În acest caz condensatorul se coboară aproximativ 1—2 cm sub platina microscopului, deoarece excesul de lumină, dat fiind dimensiunile extrem de mici ale bacteriilor, face imposibilă observarea lor.

În executarea unui examen al bacteriilor în stare vie trebuie respectate următoarele reguli :

— lama și pipeta Pasteur trebuie să fie bine răcite pentru a nu omorî bacteriile ;

— observarea la microscop trebuie făcută cît mai repede după depunerea picăturii pe lamă, pentru a nu se usca.

După examinare, preparatul se pune într-un vas cu amestec dezinfectant.

În urma examenului microscopic pe un preparat umed între lamă și lamelă pot fi evidențiate două tipuri de mișcări : active și pasive.

Mișcările active sînt datorate flagelilor bacterieni. Au loc în toate direcțiile cîmpului microscopului și sînt mișcări de înaintare rostogolire, de răsucire etc.

Mișcările pasive sînt simple trepidații pe loc ale bacteriilor, datorate fie înclinării platinei microscopului, fie existenței unui curent de lichid. Au loc într-o singură direcție și anume, fie în direcția înclinării platinei, fie în direcția curentului de lichid. Tot în această categorie intră și mișcările browniene, datorate mișcării moleculelor de lichid care antrenează și germenii.

11.9.2. EXAMENUL BACTERIILOR PE FROTIURI COLORATE

Această modalitate de examinare a bacteriilor are o utilizare mult mai largă permițînd precizarea caracterelor morfologice, a afinităților tinctoriale, a structurilor intra- și extraparietale.

Preparatele microbiene pe lame de sticlă se numesc frotiuri. Pentru realizarea frotiurilor se folosesc lame de sticlă curate și bine degresate.

Degresarea se face prin păstrarea lamelor în alcool. Înainte de utilizare lamele se flambează prin trecerea lor prin flacăra becului de gaz. Frotiurile pot fi efectuate fie din culturi bacteriene dezvoltate pe medii de cultură solide, fie din culturi bacteriene în medii lichide. În primul caz, se folosește ansa, iar în al doilea caz se folosește pipeta Pasteur.

Tehnica frotiurilor realizate din culturi pe medii solide

Materiale necesare :

— cultura bacteriană crescută pe mediu de cultură solid (geloză înclinată) ;
— apă fiziologică sterilă ;
— ansă ;
— lame curate și degresate ;
— bec de gaz ;
— stativ de colorare, cristalizor ;
— colorant ;
— creion dermatograf.

Tehnica de lucru

Timpii de efectuare ai unui frotiu sînt următorii :
— etalarea ;
— uscarea la temperatura camerei ;
— fixarea ;
— colorarea.

Etalarea — reprezintă cea mai importantă operație din tehnica frotiurilor, deoarece de modul în care este realizată depinde bune examinare la microscop. Dacă frotiul nu este bine etalat, el va prezenta la microscop aglomerări de bacterii, care nu vor permite distingerea amănuntelor de morfologie.

Etalarea constă în întinderea produsului de examinat pe lamă cu ajutorul ansei în așa fel încît să se realizeze un strat subțire și uniform care să cuprindă centrul lamei și să nu atingă marginile ei. Cultura bacteriană recoltată în bucla ansei se omogenizează într-o picătură de apă fiziologică depusă în prealabil pe lamă, după care se întinde în cercuri concentrice cu bucla ansei.

Lama cu frotiul întins se așează pe stativul de colorare și se lasă să se usuce la temperatura camerei sau la termostat.

Fixarea este o operație absolut obligatorie în tehnica coloratiei bacteriene. Prin fixare are loc o denaturare a proteinelor structurale care duce pe de o parte la moarte bacteriilor, ceea ce înlătură posibilitatea de infectare, iar pe de altă parte face ca preparatul să adere mai bine pe lamă. Se pare că denaturarea proteinelor celulare prin procesul de fixare ar avea rol în mecanismul intim al colorației, în sensul că mărește afinitatea acestora pentru colorant.

Agentul folosit pentru fixare este căldura. Fixarea prin căldură se face trecînd lama, cu frotiul în sus, prin flacăra becului de gaz. Fixarea nu trebuie să dureze mai mult de 5—10 secunde, iar temperatura să nu fie prea ridicată, pentru a nu modifica structura protoplastului bacterian. Se consideră fixarea terminată atunci cînd apropiind lama cu

partea opusă frotiului de dosul palmei, simțim că aceasta nu mai suportă căldura lamei.

Fixarea se poate realiza și cu ajutorul unor agenți chimici cum sînt : alcoolul metilic, alcoolul etilic sau amestec de alcool și eter.

După ce frotiul a fost fixat se trece la ultima etapă care este colorarea.

Tehnica frotiurilor din culturi pe medii lichide

Materiale necesare :

— cultura bacteriană în mediu lichid ;
— pipete Pasteur sterile ;
— lame curate și degresate ;
— stativ de colorare ;
— cristalizor ;
— bec de gaz ;
— creion dermatograf ;
— vas cu amestec dezinfectant.

Tehnica de lucru

Timpii de efectuare ai frotiurilor dintr-o cultură în mediu lichid sînt aceiași ca și în cazul anterior. Deosebirea constă în aceea că în acest caz etalarea se face cu ajutorul pipetei Pasteur în felul următor : se recoltează steril cu pipeta Pasteur din cultura bacteriană și se depune în centrul lamei o picătură de cultură care apoi se întinde cu ajutorul pipetei Pasteur, executîndu-se un frotiu similar cu cel de pe mediul solid. După ce frotiul a fost executat, pipeta cu restul de lichid se pune în vasul cu amestec dezinfectant. Frotiul se lasă să se usuce la temperatura camerei, se fixează și se colorează.

11.9.3. METODE DE COLORARE

Coloratia reprezintă o reacție de combinare între unii constituienți ai celulei bacteriene și substanța colorantă. Ca urmare a acestui fapt, rezultatul colorării depinde atît de proprietățile chimice ale colorantului cît și de compoziția chimică a constituienților celulari.

În general, cu cît activitatea metabolică a unui microorganism este mai intensă, cu atît conținutul său este mai bogat în nucleoproteine și afinitatea pentru coloranți este mai mare. Ca urmare, bacteriile tinere, aflate în baza de multiplicare activă se colorează mai intens și mai omogen decît cele aflate în faza staționară.

Coloranții folosiți în tehnica bacteriologică sînt compuși sintetici, din grupul anilinci, extrași din gudroanele de huilă. În mod curent ei sînt folosiți sub formă de săruri, deoarece în stare de baze sau de acizi liberi sînt puțin sensibili. După natura lor chimică coloranții pot fi substanțe acide sau bazice, reacționînd după caz cu acizii sau bazele.

Dintre coloranții bazici cei mai folosiți sînt : albastru de metilen, albastru de toluidină, cristal violet, fuxină bazică, fuxină violet, violet de Gențiană, verde briliant, verde de metil etc.

Dintre coloranții acizi se folosesc mai des : fuxina acidă, eozina, roșul de Congo etc. În microscopie coloranții se folosesc sub formă de

soluții apoase, care nu rezistă timp îndelungat și sub formă de soluții saturate alcoolice cu durabilitate indefinită, din care se prepară soluțiile apoase. În general soluțiilor apoase li se adaugă fenolul ca mordant.

Prepararea coloranților

Prepararea soluției saturate :

— alcool 96° . . . . . 100 ml
— colorant . . . . . 10—15 g

Se majorează colorantul cu o parte din alcool și apoi se adaugă în porțiuni mici, restul alcoolului, căutînd să îndepărtăm toată substanța colorantă din mojar,

Amestecul se ține cîteva zile la termostat pentru maturare, în flacoane închise etanș, agitînd din cînd în cînd, apoi se păstrează la temperatura camerei. Din această soluție saturată sau soluție mamă se prepară apoi soluția apoasă.

Prepararea soluțiilor apoase, plecînd de la soluția mamă, se face astfel :

— soluție mamă filtrată . . . . . 10 ml
— fenol cristalizat . . . . . 2 ml
— apă distilată . . . . . 100 ml

În mod obișnuit se prepară apă fenolată 2%, în care se înglobează cei 10 ml de soluție saturată filtrată.

Alt mod de preparare al coloranților, fără a utiliza o soluție saturată, îl constituie metoda soluțiilor hidro-alcoolice. În acest fel se pot prepara cei mai mulți coloranți folosiți în microbiologie.

Tehnica preparării coloranților în soluții hidro-alcoolice fenicate

Substanță colorantă	Alcool etilic absolut	Acid fenic cristalizat	Apă distilată
Violet gențiană 1 g	10 ml	2 g	90 ml
Albatru de toluidină sau metilen 1,5 g	10 ml	2 g	90 ml
Fuxină bazică 1 g	10 ml	5 g	90 ml
Safranină 1 g	10 ml	—	90 ml

Se mojarează colorantul cu alcoolul absolut, se adaugă acidul fenic, apoi în cantități fracționate, amestecînd mereu, apă distilată 60 ml. Se pune amestecul într-o sticlă brună, se spală cu restul de 30 ml apă distilată mojarul și se adaugă amestecului. Se lasă în repaus 24 ore, se decantează sau se filtrează. Se conservă în sticlă de culoare închisă la adăpost de lumină.

În microbiologie sînt folosiți destul de des mordanții. Mordantul are rolul de a favoriza combinarea chimică între două corpuri, care nu au nici o afinitate chimică unul pentru altul. Pe de o parte el sensibilizează în anumite condiții țesutul formînd cu el o combinație stabilă,

accentuîndu-i astfel electivitatea pentru colorant şi pe de altă parte el produce cu colorantul un precipitat mai intens colorat insolubil în apă.

Unul din mordanţii necesari :

Soluţia Lugol

— iod metalic . . . . . 1 g
— iodură de K . . . . . 2 g
— apă distilată . . . . . 300 ml

Se dizolvă iodura de K în apă şi ulterior se adaugă iodul. Soluţia trebuie protejată de acţiunea luminii şi a căldurii.

Soluţie decolorant pentru Gram

Alcool-acetonă :

alcool 96° . . . . . 3 părţi
acetonă . . . . . 1 parte

Este absolut necesar ca în acest caz să se folosească numai alcool de 96°, deoarece scăderea concentraţiei chiar la 80°, face ca decolorantul să nu mai diferenţieze bine bacteriile Gram pozitive de cele Gram negative.

În tehnica colorаţiilor bacteriene deosebim trei categorii de metode :
— coloraţia simplă ;
— coloraţia compusă sau diferenţiată ;
— coloraţia specială.

Coloraţia simplă — utilizează un singur colorant care este de obicei bazic şi permite stabilirea morfologiei bacteriene şi punerea în evidenţă a elementelor celulare din produsele patologice.

Coloranţii bazici cei mai des utilizaţi în coloraţia simplă sînt fuxina fenicată diluată 1/10, albastru de metilen fenicat.

11.9.3.1. Metoda coloraţiei simple

Coloraţia simplă cuprinde următorii timpi :

— fixarea la flacără a frotiului după etalare şi uscare la temperatura camerei ;

— colorare — se acoperă frotiul cu soluţia de colorant, care se păstrează pe lamă 1—2 minute ;

— vărsarea colorantului în cristalizor şi spălarea cu apă de robinet

— uscarea frotiului la temperatura camerei ;

— examinarea la microscopul cu imersie.

În general, în coloraţia simplă, bacteriile apar colorate omogen în culoarea colorantului folosit, ca şi cum toate structurile celulare ar fi omogene. Acest aspect este un artefact de coloraţie datorat faptului că diferitele componente ale celulei bacteriene, deşi sînt diferenţiate ca structuri bine definite, au o afinitate aproximativ egală pentru coloranţii bazici pe care îi fixează uniform. Astfel dacă pentru colorare se foloseşte soluţia de fuxină fenicată diluată 1/10 toate elementele preparatului vor apare colorate în roşu, iar dacă se foloseşte soluţia fenicată de albastru de metilen, toate elementele preparatului vor apare colorate în albastru.

11.9.3.2. Coloraţii compuse

Dintre coloraţiile compuse, coloraţia Gram şi coloraţia Ziehl-Neelsen, au cea mai largă utilizare în bacteriologie.

Este o metodă de colorare imaginată de Cristian Gram, elev al lui Koch, care a descoperit această coloraţie pe baze empirice. Este o metodă de colorare compusă, deoarece foloseşte pentru punerea în evidenţă a celulei bacteriene, acţiunea a doi coloranţi : violet de genţiană şi fuxină. Este în acelaşi timp şi o metodă de colorare diferenţiată, deoarece în funcţie de afinităţile lor tinctoriale, bacteriile se împart în două mari categorii : bacterii Gram pozitive şi bacterii Gram negative.

Soluţiile folosite în coloraţia Gram

— violet de genţiană fenicat — soluţie hidro-alcoolică de violet de genţiană ;

— soluţia Lugol — 1 : 2 : 300 (soluţia mordant) ;

— alcool-acetonă ;

— fuxina fenicată diluată 1/10 — soluţie hidroalcoolică fenicată.

Tehnica coloraţiei Gram

Coloraţia Gram cuprinde patru timpi :

Se fixează frotiul la flacără.

1. colorarea — se acoperă frotiul fixat cu violet de genţiană şi se ţine 1—2 minute ;

— se varsă colorantul şi se spală preparatul cu apă de robinet. Violetul de genţiană va colora toate elementele preparatului în violet.

2. *mordansarea* — se acoperă frotiul cu soluţia Lugol 1 : 300 şi se ţine 2—3 minute, apoi se varsă ;

— nu se spală cu apă de robinet. Mordantul (soluţia Lugol) reacţionează cu violetul de genţiană formînd un complex iodat stabil la unele bacterii şi instabil la alte.

3. *decolorarea* — timpul cel mai important al coloraţiei — se acoperă frotiul cu soluţia de alcool-acetonă şi se înclină lama pentru a favoriza acţiunea decolorantului, timp de 5—7 secunde. Se varsă soluţia decolorant, şi se spală repede cu apă de robinet pentru a opri decolorarea. Prin această operaţie se vor decolora elementele preparatului la care complexul iodat este instabil, alcool-acetonă solubilizînd acest complex. Vor rămîne colorate în violet, rezistînd la decolorare bacteriile la care complexul iodat este stabil.

4. *recolorarea* — se acoperă frotiul cu soluţia de fuxină diluată 1/10 şi se ţine 1—2 minute, după care se varsă colorantul, se spală frotiul cu apă de robinet, se usucă şi se examinează la microscopul cu imersie. Dacă frotiul este realizat dintr-un amestec de bacterii sau dintr-un produs patologic, se vor observa elemente colorate diferit.

Unele bacterii care au rezistat la decolorare avînd complexul iodat stabil, insolubil, apar colorate în violet. Acestea au primit denumirea de bacterii Gram pozitive. Alte bacterii, la care complexul iodat este solubilizat prin acţiunea alcool-acetonei apar colorate în roşu, în urma recolorării cu fuxină. Acestea sînt bacterii Gram negative.

Un rol deosebit de important în colorația Gram îl are vîrsta culturii din care se face frotiul. Este de menționat faptul că numai culturile tinere în vîrstă de 16—18 ore dau colorații Gram adevărate.

Exemple de bacterii Gram pozitive și Gram negative :

— bacterii Gram pozitive : *Bacillus cerus, B. subtilis, B. megaterium, B. anthracis, B. tetani* etc. și unii coci : pneumococii, stafilococii și streptococii.

— bacterii Gram negative : *Escherichia coli, Proteus vulgaris, Salmonela typhi,* gonococul, meningococul etc.

Colorația Ziehl-Neelsen.

Această metodă de colorare este cunoscută și sub denumirea de tehnica colorației germenilor **acido-alcoolo-rezistenți.**

Este folosită pentru evidențierea bacilului tuberculozei, a bacilului leprei și a altor bacterii care sînt acido-alcoolo-rezistente. Aceste microorganisme, datorită structurii lor deosebite, se colorează greu prin metode obișnuite de colorare. Evidențierea microscopică a acestor bacterii se face folosind soluții colorante și concentrate care pătrund în celulă numai în urma încălzirii preparatului. Odată colorate cu astfel de soluții, bacteriile rezistă la decolorare cu alcool și acizi minerali diluanți, care scot cu ușurință colorantul din celulele altor grupe de bacterii.

Rezistența la decolorare cu alcool și acizi minerali este legată de prezența în peretele celular a unor substanțe ceroase din grupa alcoolilor superiori, numite mycoli, care nu permit difuzia și absorbția colorantului decît la cald și în soluții concentrate fenicate.

Datorită acestui comportament bacteriile respective au primit denumirea de bacterii acido-alcoolo-rezistente. Aceste bacterii aparțin Actinomicetelor și în special genului *Mycobacterium* din care fac parte bacilul tuberculozei *(Mycobacterium tuberculosis)* la om, agentul patogen al tuberculozei la animale *(Mycobacterium bovis)* și agentul patogen al leprei *(Mycobacterium leprae).*

Soluțiile folosite în colorația Ziehl-Neelsen :

— fuxină fenicată concentrată 10%, numită și fuxină Ziehl ;

— acid sulfuric diluat 1/5 ;

— alcool 96° ;

— soluție hidroalcalină fenicată de albastru de metilen.

Tehnica colorării Ziehl-Neelsen

Colorația cuprinde patru timpi :

1. *colorare* — frotiul fixat la flacără se acoperă cu fuxina Ziehl, încălzindu-se ușor dedesupt, de 2—3 ori, pînă la emisie de vapori (fără a ajunge la fierbere) timp de 10 minute. În acest interval, frotiul trebuie să fie permanent acoperit de colorant. Dacă prin evaporare cantitatea de colorant scade, se adaugă o nouă cantitate de colorant pentru a evita degradarea preparatului. Se varsă colorantul și frotiul se spală cu apa de robinet.

2. *prima decolorare* — se acoperă frotiul cu acidul sulfuric diluat 1/5, care se ține 4 minute. Se varsă decolorantul și se spală cu apă de robinet.

3. *a doua decolorare* — se acoperă frotiul cu alcool 96°, care se ține pe lamă 3 minute. Se varsă, se spală cu apă de robinet.

4. *recolorare* — se acoperă frotiul cu soluția de albastru de metilen timp de 1—2 minute, după care preparatul se spală cu apă, se usucă și se examinează la microscopul cu imersie. Dacă frotiul este făcut dintr-un produs patologic (spută) vor apare elemente colorate diferit : toată flora normală va apare colorată în albastru, în timp ce bacteriile acido-alcoolo-rezistente vor apare colorate în roșu.

Tehnica Ziehl-Neelsen este o metodă de diagnosticare a tuberculozei în produsul patologic.

11.9.3.3. Coloraţii speciale

Tehnicile de colorație specială sînt folosite pentru punerea în evidență a structurilor intra- și extraparietale, care nu pot fi observate prin metode obișnuite de colorare cum sînt : peretele celular, materialul nuclear (nucleoid), sporul, capsula, incluziunile, flagelii bacterieni și altele.

Colorarea peretelui celular bacterian

Peretele celular este o structură rigidă care înconjoară de jur împrejur celula bacteriană fiind strîns lipit de membrana plasmatică. Existența peretelui celular a fost bănuită de foarte multă vreme, datorită formei relativ constante a celulelor bacteriene. Evidențierea lui s-a făcut însă, relativ tîrziu, datorită indicelui de refracție foarte mic, a structurii foarte fine și a faptului că se colorează cu coloranți obișnuiți la fel ca și citoplasma.

În general peretele celular este în contact foarte strîns cu membrana plasmatică, ceea ce face ca evidențierea acestei structuri să se realizeze numai cu ajutorul coloranților selectivi, fie cu ajutorul unor artificii de tehnică prin care peretele celular este desprins de membrană plasmatică. Dintre coloranții specifici peretelui celular amintim :

— albastru alcian în soluție acidă 1% (pH = 2,5) colorează în mod specific peretele celular, în albastru, în timp ce citoplasma nu se colorează de loc sau se colorează în bleu-pal.

— albastru Victoria în soluții 1% colorează selectiv peretele celular.

Soluțiile folosite pentru colorarea peretelui celular :

— soluție de formaldehidă 0,5%

— soluție apoasă de albastru alcian 1%.

Tehnica colorării peretelui celular cuprinde doi timpi :

1. fixarea frotiului după uscare cu o soluție de formaldehidă 0,5%, care se ține pe lamă 5 minute, după care se spală cu apă de robinet ;

2. colorare — se acoperă frotiul cu soluția de albastru de alcian 1%, care se ține pe lamă timp de 1 minut, după care se spală, se usucă și se examinează la microscopul cu imersie.

Pe preparatele colorate după această tehnică peretele celular apare în contur albastru, citoplasma bleu-pal sau incoloră.

Colorarea sporului bacterian

Sporul bacterian este o structură intraparietală, care apare numai la bacteriile sporogene. În general este prezent la bacteriile cilindrice și

în mod excepțional la coci. Este constant la genul *Clostridium* și facultativ la genul *Bacillus*.

Sporul tipic bacterian este cunoscut sub denumirea de endospor. Acesta are forma sferică sau ovală și este unic în celula bacteriană. În funcție de poziția lor în celulă sporii pot fi terminali (a), subterminali (b) și ecuatoriali sau centrali (c).

În majoritatea cazurilor, diametrul sporilor este egal cu diametrul celulei bacteriene sporogene. Acest tip de spor este nedeformat și este caracteristic genului *Bacillus*.

Există însă și unele cazuri în care diametrul sporului este mai mare decît cel al celulei bacteriene, determinînd o deformare a acesteia. Din acest motiv acești spori au primit denumirea de spori deformanți și sînt cel mai adesea întîlniți la genul *Clostridium* (fig. 261).

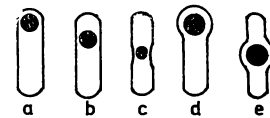


Fig. 261. Poziția sporilor în celula bacteriană: a — terminal; b — subterminal; c — ecuatorial; d—e — spori deformanți.

Datorită consistenței speciale, endosporii bacterieni nu se colorează cu metode obișnuite de colorare, în care caz apare ca formațiuni refringente, strălucitoare, înconjurate de o membrană groasă.

Evidențierea microscopică a endosporului se face numai cu ajutorul unor metode speciale de colorare care utilizează coloranți specifici. Una din metodele speciale de colorare a endosporului este tehnica Benito-Trujillo, în care soluția colorant este folosită la cald pentru a permeabiliza învelișurile sporale și a favoriza pătrunderea colorantului în celula sporală și deci colorarea sporului.

Soluții folosite pentru colorarea sporului

— soluție apoasă de verde malachit 0,5%

— soluție apoasă de fuxină 0,25%.

Verdele malachit este un colorant selectiv pentru sporul bacterian, care la cald poate să străbată învelișurile speciale și să coloreze stabil conținutul sporului.

Tehnica colorației Benito-Trujillo

Se face un frotiu dintr-o cultură bacteriană sporulată în vîrstă de 18—24 ore, care după uscare se fixează la flacără. Urmează colorația propriu-zisă care constă în:

1. colorare — se acoperă lama cu soluția de verde malachit care se lasă 5 minute, timp în care se încălzește pînă la emisie de vapori de 3 ori, adăugînd colorant proaspăt înainte de fiecare încălzire. Se varsă colorantul, se lasă lama să se răcească și se spală cu apă de robinet.

2. colorare de contrast — se acoperă frotiul cu soluția de fuxină 0,25%, care se lasă să acționeze 1 minut după care se varsă colorantul,

se spală cu apă de robinet, se usucă și se examinează la microscopul cu imersie. La examenul microscopic, sporii vor apare colorați în verde, iar celula vegetativă în roșu.

Coloraţia capsulei

Capsula este o structură extraparietală întîlnită la bacteriile care au proprietatea de a sintetiza în cursul metabolismului lor o substanță lipicioasă, mucilaginoasă, pe care uneori o pot depune în cantitate mare de jur împrejurul peretelui celular.

Culturile bacteriene capsulate au un aspect caracteristic și anume în mediu de cultură lichid prezența capsulei conferă un aspect viscos, siropos, în timp ce pe mediul de cultură solid, culturile capsulate au un aspect strălucitor, mucoid, cu tendința de a se prelinge pe suprafața mediului.

Pe preparate fixe, colorate cu tehnici obișnuite, capsula nu se colorează, apare ca un halou incolor în jurul celulei bacteriene.

Evidențierea microscopică a capsulei se face prin tehnici de colorare prin care materialul capsular apare colorat diferit de restul celulei.

Pentru colorarea capsulei în laborator se folosesc două metode speciale și anume :

a) coloraţia negativă

b) coloraţia Kllet.

a) *Coloraţia negativă* — implică colorarea fondului preparatului, în timp ce capsula rămîne incoloră.

Soluțiile folosite pentru colorarea capsulei :

— roșu de Congo soluție 1% ;

— soluția mordant complexă formată din fenol 5% — 30 ml, CH_3COOH 20% — 10 ml, $FeCl_3$ 30% — 4 ml și soluție apoasă de fuxină acidă 1% — 2 ml.

Tehnica coloraţiei negative

Se face un frotiu din cultura capsulată *(Bacillus siliceus, Azotobacter sp.)* într-o picătură de roșu de Congo 1%. Se lasă să se usuce și se acoperă frotiul cu o soluție mordant complexă care se lasă să acționeze 2 minute. Se varsă mordantul, se spală cu apă de robinet, se usucă și se examinează la microscopul cu imersie.

Pe acest preparat, fondul apare colorat în roșu cărămiziu, bacteriile în roz, iar capsula incoloră.

b) *Coloraţia Klett* — metodă specială de evidențiere a capsulei.

Soluţiile necesare :

— soluție hidroalcoolică fenicată de albastru de metilen 1% ;

— soluție hidroalcoolică fenicată de fuxină diluată 1/10.

Tehnica coloraţiei Klett

Se face un frotiu în apă fiziologică sterilă, se usucă și se fixează la flacără.

Coloraţia constă în :

1. — *colorare* — se acoperă frotiul cu soluția de albastru de metilen 1% și se lasă 5 minute în care se fac 2—3 încălziri pînă la emisie de vapori. Se varsă colorantul, se lasă să se răcească și se spală cu apă de robinet.

2. — *colorare de contrast* cu soluția de fuxină diluată 1,10,5 secunde. Se varsă colorantul, se spală, se usucă și se examinează la imersie.

Pe acest preparat materialul capsular apare colorat în albastru, iar celula bacteriană roz—roșu.

Colorația incluziilor

Incluziile sînt structuri mai aparte, situate în citoplasmă, inerte din punct de vedere biologic. Prezența și numărul lor într-o celulă bacteriană sînt condiționate de anumiți factori de mediu.

După compoziția lor chimică există trei tipuri de incluzii :

a) — incluzii formate din polimeri organici (incluzii de glicogen, de amidon, de poli B-hidroxibutirat și proteine).

b) — incluzii formate din polimeri anorganici în care intră incluziile de polimetafosfat numite și de volutină.

c) — incluzii anorganice simple formate din sulf și carbonat de calciu.

Incluziile de glicogen și de amidon sînt neregulate refrigerente. Se colorează caracteristic cu soluția Lugol în felul următor : incluziile de amidon în albastru, iar cele de glicogen în galben-brun. Ele pot fi puse ușor în evidență la *Clostridium pasteurianum, Azobacter* și la drojdii. Pentru evidențierea incluziilor de glicogen la drojdii, se face un preparat între lamă și lamelă, punînd o picătură din cultura de drojdie obișnuită într-o soluție sterilă de zaharoză 10%, peste care se adaugă o picătură din soluția Lugol. Celulele vor apare colorate în galben, iar incluziile în brun—închis.

Incluziile de poli B-hidroxibutirat sînt delimitate la periferie de o membrană și au o structură internă lamelară concentrică.

Incluziile de polimetafosfat sînt cunoscute și sub denumirea de incluzii de volutină, deoarece au fost descoperite la *Spirillum volutans*. Sînt denumite și granulații Babeș—Ernst, deoarece aceștia le-au descris prima dată. Sînt caracteristice pentru genurile *Corynebacterium, Azobacter, Spirillum.*

În general incluziile au aspectul unor granulații cu o refringență variabilă de la caz la caz, în funcție de compoziția lor chimică.

Evidențierea în celulă a incluziilor se poate face prin diverse tehnici de colorare în funcție de tipul de incluzie.

La microscopul optic, incluziile apar ca niște granulații refringente, strălucitoare.

Pe preparate fixe și colorate simplu, incluziile apar ca niște zone incolore, cu excepția incluziilor metacromatice (de volutină).

În mod precis, evidențierea incluziilor se face cu ajutorul coloranților selectivi dintre care amintim :

— amidoschwartz sau negru de amidon, care este un colorant specific pentru incluziile proteice pe care le colorează în negru ;

— negru sudan — colorant specific pentru incluziile de poli B-hidroxibutirat pe care le colorează în negru ;

— iodul din soluția Lugol este un colorant specific pentru incluziile de amidon pe care le colorează în albastru și pentru cele de glicogen, pe care le colorează în brun ;

— colorantul D'Albert — reprezintă un complex de coloranți (albastru de toluidină — 0,15 ; verde malachit — 0,2 g ; alcool etilic — 2 ml ; acid acetic — 1 ml și apă distilată — 100 ml), care colorează în mod specific incluziile de volutină în albastru închis.

Colorația incluziilor de volutină

Se face un frotiu dintr-o cultură de *Bacillus cereus* care se fixează la flacără.

Colorația constă în :

1. — *colorare* — se acoperă frotiul cu soluția D'Albert care se lasă 3—5 minute. Se varsă colorantul și se spală cu apă de robinet.

2. — *mordansare* — se acoperă frotiul cu soluția Lugol 1 : 2 : 300 și se lasă 1 minut. Se varsă soluția, se spală, se usucă și se examinează la microscopul cu imersie.

Incluziile de volutină apar în albastru închis, iar celulele în verde.

11.10. CULTURA ÎN LABORATOR A MICROORGANISMELOR EUCARIOTE

Din multitudinea de microorganisme eucariote (alge verzi unicelulare, drojdii, ciuperci microscopice filamentoase, protozoare) utilizate ca modele experimentale în cercetările de biologie celulară, genetică, fiziologie, ca organisme test pentru stabilirea efectului poluant, mutagen și/sau carcinogen al unor agenți fizici și chimici sau în industria fermentativă, de sinteză proteică, a medicamentelor, vom prezenta succint principalele carcteristici și condițiile de cultivare de la *Chlamydomanas reinhardii, Saccharomyces cerevisiae, Mucor mucedo, Aspergillus niger* și *Penicillum notatum.*

11.10.1. ALGELE MICROSCOPICE — CARACTERISTICI GENERALE

Dintre algele unicelulare cu organizare eucariotă speciile utilizate cel mai frecvent în cercetarea biologică aparțin genurilor *Chlorella, Scenedesmus* și *Chlamydomonas.*

Speciile genului Chlorella sînt limnicole (de apă dulce), dar sînt destul de frecvente și pe solurile umede. Ciclul de viață, numai în parte descifrat este haploid. Nu s-a evidențiat decît o înmulțire asexuată ce cuprinde patru faze :

— creșterea activă a masei celulare
— maturarea timpurie
— maturarea tîrzie
— diviziune cu eliberare de auxospori (autospori).

Aceste faze au putut fi stabilite pe baza conținutului în ADN. În faza de maturare timpurie ADN se replică de patru ori, iar la sfîrșitul fazei de maturare tîrzie cantitatea de ADN este de 16 ori mai mare decît ADN dintr-un nucleu interfazic. Cromozomii de *Chlorella* sînt deci, temporar politeni. În urma diviziunii celulei mature „gigantice", multinucleate, se formează 4 pînă la 32 auxospori, care vor fi eliberați prin plesnirea membranei celulei inițiale.

Genul Scenedesmus cuprinde mai multe specii de apă dulce, planctonice cu tal cenobial. Cenobiul este constituit, în general din 4 (mai rar 2, 8 sau 16) celule asociate. Se înmulțesc asexuat prin auxospori (autospori). Ciclul de viață este haploid și cuprinde trei faze: creșterea celulelor în volum; diviziunea celulară ce duce la formarea, inițial, a două și ulterior a patru autospori asociați într-un cenobiu; eliberarea cenobiului din celula mamă.

Speciile genului Chlamydomonas trăiesc în special în apele dulci stătătoare. Talul lor unicelular este solitar, mobil, prezentînd doi flageli în partea anterioară. În condiții optime de viață se înmulțesc prin zoospori. În celula generatoare se formează doi pînă la 16 zoospori biflagelați identici. Înainte de diviziune, celula mamă își pierde flagelii și se transformă într-un zoosporocit. La maturitate zoosporii sînt eliberați din celula generatoare. Înmulțirea sexuată este asigurată de indivizi masculi, mt$^+$ și femeli, mt$^-$, care nu se deosebesc morfologic dar care în condiții de viață nefavorabile se transformă în gameți de sex diferit. Copulația a doi gameți de tip opus de împerechere duce la formarea zigotului diploid, protejat de o capsulă. În zigot se produce meioza, prin care se formează 4 celule haploide (2mt$^+$ și 2mt$^-$). Aceste celule haploide numite și zoospori se înmulțesc asexuat formînd clone* haploide, iar în condiții nefavorabile se diferențiază gameți și se realizează ciclul sexuat (Fig. 262). Deci, în ciclul de viață, haplofaza este predominantă, diplofaza fiind reprezentată doar de zigot.

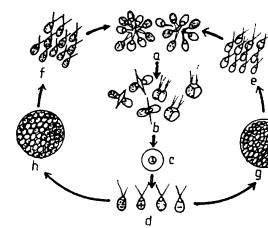


Fig. 262. Ciclul de viață la *Chlamydomonas reinhardtii*: e—f — gameți de tip de împerechere + și — (mt$^+$ și mt$^-$); a — stadiu inițial de copulare; b — copularea între gameții de tipuri opuse de împerechere; c — zigotul 2n; d — gameți mt$^+$ și mt$^-$, rezultați în urma diviziunii meiotice; h—g — colonii rezultate prin multiplicarea gameților mt$^+$ și mt$^-$.

11.10.2. MEDII DE CULTURĂ PENTRU DEZVOLTAREA ALGELOR MICROSCOPICE

Mediul FDGA (Zaharov, Kvitko, 1967) *pentru algele din genurile Chlorella și Scenedesmus*

Glucoză	20 g
KNO_3	1,440 g
KH_2PO_4	0,156 g
$MgSO_4$	0,100 g
$CaSO_4$	0,010 g

* Clonă = o cultură omogenă genetic, obținută în urma înmulțirii asexuate (diviziune mitotică) a unei celule uninucleate.

$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,02	mg
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,01	mg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,04	mg
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	1,00	mg
Na_3BO_3	1,40	mg
$(NH_4)_2MoO_4$	0,50	mg
$FeSO_4$	0,013	mg
EDTA	0,05	mg
Agar—agar	20,0	g
Apă distilată	1000	ml

Mediu pentru Chlamydomonas sp.

Acetat de sodiu	2,0	g
Peptină	5,0	g
Autolizat de drojdie	5,0	ml
Soluție Bejerink	100	ml
Tampon fosfat	100	ml
Soluție microelemente	1	ml
Agar—agar	20	g
Apă distilată	1000	ml

Soluție Bejerink

NH_4NO_3	3,0	g
K_2HPO_4	0,2	g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2	g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,1	g
Apă distilată	1000	ml

Soluție de microelemente

K_3BO_3	100	mg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	100	mg
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	400	mg
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	20	mg
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	20	mg
$CuSO_2$	4	mg
Apă distilată	1000	ml

Soluție tampon fosfat (pH = 6,8)

K_2HPO_4	7,17	g
K_2PO_4	3,63	g
Apă distilată	1000	ml

Se sterilizează prin autoclavare 15 minute la 120°C.

11.10.3. DROJDIILE — CARACTERISTICI GENERALE

Drojdiile sînt ciuperci unicelulare, predominant saprofite, care în marea majoritate nu structurează o rețea hifală. Doar unele specii formează lanțuri celulare, așa numitele pseudomicelii. Celulele de drojdie au forme variate (ovale, sferice, alungite) în funcție de specie, sînt diploide și au un număr de cromozomi aproximat la $2n = 34$.

Ciclul de viață la *Saccharomyces cerevisiae* include atît o fază diploidă cît și una haploidă (Fig. 263). Înmulțirea asexuată se realizează prin înmugurire. Mugurele nou format primește un complement complet de gene nucleare și o parte din citoplasma celulei mamă, ce include și organite celulare.

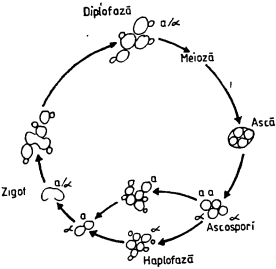


Fig. 263. Ciclul de viață la *Saccharomyces cerevisiae.*

În condiții de viață nefavorabile sau în cazul în care celulele diploide sînt plasate pe un mediu de sporulare, creșterea vegetativă încetează, pertele celular se îngroașă, iar în urma meiozei și sporulării se formează o ască cu 4 ascospori. Ascosporii și celulele haploide care se formează după germinare reprezintă haplofaza. Celuelele haploide aparțin la două tipuri de împerechere „a" și „α". Tipul de împerechere este determinat de alelele locusului MAT (mating) „a" și „α" care controlează procese complexe, împerecherea, meioza și sporularea. Cînd două tulpini de tip opus de împerechere („a„ și „α") sînt însămînțate pe același mediu de cultură se realizează fuziunea celulară și formarea zigoților diploizi. Într-un mediu nutritiv bogat zigoții se înmulțesc vegetativ prin înmugurire formînd clone diploide. Deci, celulele de drojdii pot forma atît diploizi stabili heterozigoți pentru alelele tipului de împerechere (a/α), dar și haploizi stabili („a" și „α").

11.10.4. ASPECTE PRIVIND FIZIOLOGIA DROJDIILOR

Drojdiile se cultivă ușor pe medii naturale (must de malț, must de struguri) sau artificiale, care conțin un glucid ca sursă de carbon și energie. Se dezvoltă optim la un pH cuprins între 5,0 și 5,6 la temperaturi de 25—30°C, în 48 ore. Sînt microorganisme aerobe, facultativ anaerobe. În condiții de aerobioză se multiplică intens și fermentează slab, iar în condiții de anaerobioză multiplicarea este slabă producîndu-se fermentația alcoolică a mediilor zaharate cu formare de alcool etilic și CO_2. Capacitatea drojdiilor de a se dezvolta în condiții de aerobioză și anaerobioză cu rezultate diferite se numește efectul Pasteur. Această caracteris-

tică prezintă o importanță practică deosebită. Astfel pentru obținerea masei celulare (biomasă protcică) drojdiile se cultivă în aerobioză, iar pentru producerea de alcool în anaerobioză.

11.10.5. MEDII DE CULTURĂ PENTRU DEZVOLTAREA DROJDIILOR

Mediu YPG (solid)

Extract de drojdii	10 g
Peptonă	10 g
Glucoză	20 g
Agar—agar	20 g
Apă distilată	1000 ml
pH = 5,6	

Se sterilizează prin autoclavare timp de 20 minute la 120°C.

Mediu YPG (lichid)

Extract de drojdii	10 g
Peptonă	10 g
Glucoză	20 g
Apă distilată	1000 ml

Se sterilizează prin autoclavare timp de 20 minute la 120°C.

11.10.6. MUCEGAIURILE — CARACTERISTICI GENERALE

Mucegaiurile sînt ciuperci microscopice filamentoase, saprofite sau parazite, cu o organizare biologică diferențiată și caracteristică, determinată de adaptările lor la diferite medii de viață. Coloniile constau din interconexarea unor filamente ramificate, numite hife, care formează în ansamblu un miceliu.

Mucegaiurile se întîlnesc în cele mai variate medii naturale, soi, ape, substanțe organice în descompunere etc., iar unele specii prezintă o importanță industrială deosebită (industria alimentară și chimică — realizarea brînzeturilor, producerea prin fermentație a acidului citric etc.; industria de medicamente — producerea penicilinei și a altor antibiotice).

Dintre speciile de ciuperci filamentoase vom descrie reprezentanții cu răspîndire mai largă și cu o importanță teoretică și practică deosebită :

— *Mucor mucedo, Aspergillus niger, Penicillium notatum*

Genul Mucor, cuprinde numeroase specii, în majoritate saprofite, importanță prezentînd *Mucor mucedo,* răspîndit pe resturile organice în descompunere, *Mucor javanicus* ce produce fermentație alcoolică, *Mucor rouxianus,* specie bogată în amilază și utilizată astfel, în fabricarea etanolului pornind de la substraturi bogate în amidon.

Miceliul la *Mucor mucedo* este alcătuit din hife continuee, neseptate din care se diferențiază hife specializate numite sporongiofori, care poartă fructificațiile. Sporongioforii pot avea un singur sporange terminal sau pot fi ramificați avînd sporangi la capetele tuturor ramurilor. Sporangele este acoperit cu spiculi de oxalat de calcio. Sporangio-

forul se continuă în sporange cu o porțiune mai dilatată numită columelă. Culoarea sporangelui este gălbuie, devenind brună la maturitate (Fig. 264).

Speciile genului Aspergillus sînt în marea lor majoritate saprofite pe sol, pe diferite produse alimentare, fructe etc. pe care formează pîsle micelare.

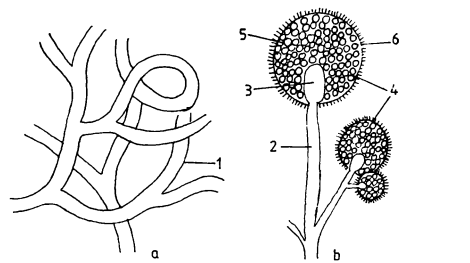


Fig. 264. Micelîu și fructificațiile la *Mucor sp.*: a — micelîu neseptat; b — sporangi cu spori; 1 — hifă ramificată neseptată; 2 — sporangiofor; 3 — columelă; 4 — sporange; 5 — spor; 6 — spiculi de oxalat de calciu.

Micelîul la *Aspergillus niger* este format din hife septate, împărțite prin pereți transversali în celule multinucleate. Din hifele septate se ridică o hifă neseptată, numită conidiofor. Pe conidiofori se inseră unul sau două rînduri de sterigme, care prin înmugurire formează lanțuri de conidii, de culoare neagră. Conidiile sînt spori asexuați, haploizi, uninucleați, utilizați pentru menținerea și transferarea culturii (Fig. 265).

La *A. nidulans* a fost evidențiată și o înmulțire sexuată, realizată cu ajutorul ascoporilor binucleați, plasați în interiorul unei fructificații de culoare neagră numită peritecie. O peritecie tînără rezultă din hife speciale (hife ascogene dicariotice) cu celule binucleate. Cei doi nuclei dintr-o celulă fuzionează pentru forma unui nucleu diploid, care intră imediat în diviziune meiotică pentru a forma patru spori haploizi. Cei patru spori se divid din nou mitotic și formează opt ascospori în fiecare ască. Nucleul din fiecare ascospor se divide mitotic rezultînd spori binucleați. În ciclul de viață la *Aspergillus* predomină haplofaza, diplofaza fiind scurtă, reprezentată de hife ascogene dicariotice.

Genul *Penicillium* este strîns înrudit cu *Aspergillus;* speciile acestui gen se înmulțesc atît asexuat (prin conidii) cît și sexuat (prin diferențierea hifelor ascogene dicariotice) cele două modalități de înmulțire determinînd cîte un ciclu sexuat și sexuat interdependente.

Caracteristic pentru genul *Penicillium* este ramificarea digitiformă a conidioforilor în partea lor superioară, ceea ce le dă un aspect de pensulă. Conidioforii sînt drepți, nemăciucați, și pe ramurile lor se inseră unul sau două rînduri de sterigme, care vor forma conidii mici, sferice, de culoare verde—cenușie (Fig. 265).

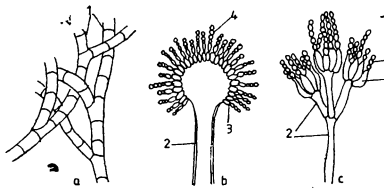


Fig. 265. Micelul și fructificațiile de *Aspergillus sp.* și *Penicillium sp.*; a — miceliu septat; b — fructificații la *Aspergillus*; c — fructificații la *Penicillium*; 1 — hifă ramificată septată; 2 — conidioforă; 3 — sterigmă; 4 conidii.

Multe specii au o importanță industrială deosebită: *P. notatum* și *P. chrysogenum* (producătoare de penicilină), *P. roqueforti* (pentru brînza de Roqueforte) și *P. comemberti* (brînza de Camembert).

11.10.7. CULTIVAREA ÎN LABORATOR A MUCEGAIURILOR

În laborator ciupercile filamentoase se dezvoltă bine pe medii cu glucoză, cum sînt: mediul Sabouraud, Czapek-DOX, must de malț, sau pe mediul de cartof, în condiții de aerobioză, la pH = 5—6 și o incubație de 2 zile la 25—30°C.

Mediul Sabouraud

Peptonă	10 g
Glucoză	40 g
Agar—agar	18 g
Apă distilată	100 ml

pH = 5,6

Se sterilizează prin autoclavare 15 minute la 120°C.

Mediul standard pentru Aspergillus și Penicillium

$NaNO_3$	2 g
KH_2PO_4	1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g
KCl	0,5 g
$FeSO_4 \cdot 7H_3O$	0,01 g
Glucoză (sau alt zahăr)	30 g
Agar—agar	20 g
Apă distilată	100 ml

pH = 5,6 — sterilzare prin autoclavare 15 minute la 120°C.

Mediul de cartof

Cartofi curățați	250 g
Glucoză	20 g
Agar—agar	20 g
Apă distilată	1000 ml

Cartofii curățați, spălați cu apă distilată și tăiați în cuburi mici, se pun într-un vas cu cca 1200 ml apă distilată și se fierb 1 oră, pînă se sfarmă. Se filtrează prin tifon dublu. Se dizolvă glucoza în 200 ml apă distilată. Se măsoară 500 ml extract de cartof, se adaugă soluția de glucoză și se completează cu apă distilată la 1000 ml. Se adaugă agarul și se sterilizează la 121°C (1 atm.), 20 minute.

Pentru obținerea și observarea directă a fructificațiilor se folosește apa agarizată.

Apă agarizată

Agar—agar	18 g
Apă distilată	100 ml
pH = 5,6	

Se sterilizează prin autoclavare timp de 30 minute la 120°C.

11.10.8. PROTOZOARELE

Protozoarele sînt cele mai simple organisme animale cu organizare, de obicei, unicelulară. Există mii de specii, foarte variate ca dimensiuni, formă, structură și caracteristici fiziologice. Majoritatea speciilor sînt sparofite, răspîndite în heleștee, bazine și ape curgătoare; sînt și specii parazite care produc boli la om și animale.

Dintre protozoare vom prezenta specia *Paramecium aurelia*, un microorganism eucariot ciliat, solitar, liber, mobil, comun în apele bogate în substanțe organice. Mobilitatea este asigurată de activitatea coordonată a cililor, ordonați pe toată suprafața celulei. Celula conține trei nuclei dintre care doi sînt mai mici și diploizi, iar cel de al treilea este mai mare și poliploid.

În condiții normale Paramecium se înmulțește asexuat prin diviziune binară. Micronucleii se divid mitotic în timp ce macronucleul suferă o bipartiție prin strangulare mediană. În condiții optime un ciclu vegetativ durează circa 5 ore.

Înmulțirea sexuată se realizează prin conjugarea indivizilor de tip opus de împerechere. Acești indivizi se unesc în regiunea peristomului (în regiunea orală) prin intermediul unei punți citoplasmatice. Macronucleul se dezorganizează, iar micronucleii se divid meiotic, formîndu-se patru nuclei haploizi din fiecare micronucleu (8 micronuclei haploizi/celulă). Dintre acești micronuclei numai unul este păstrat, ceilalți 7 fiind lizați de enzime celulare. Acest micronucleu se divide, generînd doi nuclei gametici. Unul dintre acești nuclei (femel) se retrage în interiorul celulei, iar celălalt (mascul) trece prin puntea citoplasmatică în celaltă celulă unde fuzionează cu micronucleul femel, rezultînd sincarionul. După diploidizare, cele două celule conjugate se separă. Sincarionul se divide de două ori mitotic, rezultînd 4 nuclei diploizi, 2 micronuclei și 2 nuclei ce-și măresc volumul și devin macronuclei. Cei 2 micronuclei se mai divid o dată, rezultînd 4 micronuclei. Această diviziune este urmată de fisiunea binară a celulei și segregarea echilibrată a nucleilor, cîte un macronucleu și 2 micronuclei în fiecare celulă (Fig. 266).

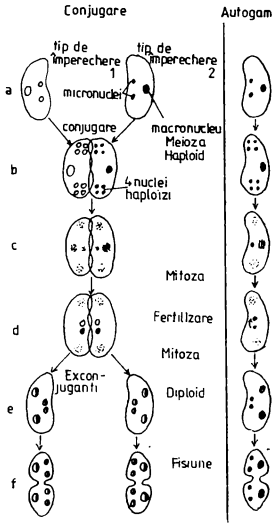


Fig. 266. Ciclul de viață la *Paramecium aurelia.*

Pentru observarea paramecilor se realizează o infuzie de fîn într-un vas de sticlă păstrat la 18—20°C. După 14 zile infuzia este bogată în protozare. Din pojghița mucilaginoasă de la suprafața lichidului se ia o picătură și se pune pe o lamă ce se acoperă cu o lamelă. Preparatul se observă la microscop. Pentru încetinirea mișcării paramecilor se pune o picătură de albuș sub lamelă.

12. INCLUDEREA MATERIALULUI BIOLOGIC ÎN RĂȘINI SINTETICE

Principiul naturalizării **plantelor și animalelor incluse** în rășini sintetice, constă în acea că ele devin total izolate de mediul extern asigurînd o păstrare îndelungată a materialului biologic în stare perfectă. Avantajos este și faptul că aceste piese nu se sparg, pot fi bine observate și analizate pe toate fețele și în general se pot procura și obține relativ ușor.

Industria chimică a pus și pune la îndemîna oamenilor de știință, muzeografilor, studenților și pe viitor profesorilor de biologie din învățămîntul nostru, rășini sintetice artificiale care pot fi folosite cu rezultate excelente în conservarea și prezentarea materialului biologic.

În obținerea acestor preparate incluse se folosesc diferiți polimeri (rășini poliesterice, rășini acrilice, rășini epoxid, celodal, polestral sau nestrapol) sau combinațiile și amestecurile lor, utilizate în industria mobilei.

Alegerea materiei prime depinde de proprietățile fizice, chimice și mecanice ale rășinii, de materialul biologic folosit și procedeele de includere.

În întreaga lume se urmărește obținerea celor mai eficiente rețete între care locul important îl ocupă rășinile poliesterice, care sînt utilizate din ce în ce mai mult datorită proprietăților chimice și mecanice deosebite, obținîndu-se rezultate bune în incluzionarea plantelor, insectelor, crustaceilor, moluștelor, unor vertebrate, fosilelor etc.

Diferiți autori *(Taborsky* 1961, *Ruzicka* 1966, *N. Barabaș* și *V. Barabaș* 1968) au publicat rezultatele procedeelor utilizate în incluzionarea materialului biologic.

Rășinile sintetice sînt amestecuri obținute prin esterifcarea în proporții molare egale a unor acizi bibazici (anhidrida acidului maleic sau acidul fumaric) cu polialcooli (amestec de alcooli, exemplu : etilen glicol — propilen glicol).

Aceste rășini sintetice se dizolvă în monomeri vinilici cum ar fi de exemplu *stirenul.*

Reacția de poliesterificare (polimerizare) este o reacție în lanț din care rezultă poliesteri lineari. Pentru polimerizarea rășinii este nevoie de o substanță *catalizator* și o substanță *accelerator.*

Catalizatorul — este un compus organic ce se descompune în condițiile sintezei, eliberînd radicalii liberi ce reprezintă centrele active ale polimerizării. Cei mai utilizați catalizatori sînt : *peroxidul de etilen-metil-cetonă (butanoxul), peroxidul de ciclo-hexanonă* și *peroxidul de benzenil.*

Acceleratorul — reprezintă o substanță reducătoare ce formează cu catalizatorul un sitsem redox. Se utilizează ca acceleratori sărurile unor metale cu valență variabilă, de exemplu : *naftanatul de Co, Cu, Pb,* etc.

Procesul de polimerizare cuprinde două faze : a. reticularea monomerului vinilic (stirenul) ; b. copolimerizarea monomerului cu rășina. În final se obține molecule tridimensionale cu aspect morfologic solid cu o consistență asemănătoare sticlei.

12.1. MODUL DE LUCRU

12.1.1. ALEGEREA ȘI PREGĂTIREA MATERIALULUI BIOLOGIC

Materialul biologic care va fi incluzionat în aceste rășini sintetice trebuie să prezinte unele însușiri esențiale cum ar fi : culoarea naturală, evidențierea perfectă a tuturor părților morfologice, să fie intact și nedeformat cu un aspect cît mai apropiat de realitate, pentru a prezenta garanția obținerii unui obiect de muzeu cît mai util și apreciat.

Pentru a putea fi incluse preparatele biologice trebuiesc *deshidratate* și *degresate.*

1. *Deshidratarea* — preparatelor biologice trebuie făcută pînă la un conținut minim de apă (100%), aceasta realizîndu-se prin mai multe procedee :

a. *la plante* se realizează prin : uscarea lentă în aer la temperatura mediului ambiant, apoi 2—3 ore la 40—50° în termostat ; uscarea unor specii de alge verzi, brune, roșii, ciuperci parazite, licheni, briofite, plante superioare între foi de sugativă ; uscarea în nisip foarte fin care este încălzit la o sursă termică ; uscarea între foi de vată hidrofilă ; introducerea în cutii cu substanțe higoscopice (sub formă de praf) cu o temperatură maximă de 40°C la plante, pentru a se menține culoarea ; deshidratarea prin electroliză, folosind un curent continuu de 0,5 A timp de 5 ore ce descompune în elementele sale componente O și H_2, 25 gr de apă.

b. *la animale* — deshidratarea se realizează prin trecerea succesivă a animalului în seria de alcool etilic cu diferite concentrații de la 15%, 35%, 55%, 75%, 96%, alcool absolut.

2. *Degresarea* — reprezintă înlăturarea substanțelor grase cu ajutorul unui solvent ce se realizează prin introducerea preparatelor în acetonă pură, eter etilic sau tiner, iar în cazul insectelor cu chitină lucioasă se folosește benzina pură în care materialul biologic trebuie ținut minimum 24 ore. După degresare, preparatele se scot și se usucă în mediul ambiant sau în termostat la 40—50°C.

12.2. MODUL DE PREGĂTIRE A DIVERSELOR MATERIALE BIOLOGICE

12.2.1. PLANTE

Algele macroscopice marine încadrate în diverse unități taxonomice : verzi, brune, roșii (exemplu : *Ulva lactuca, Enteromorpha linza, Cladophora sp., Cystoseira barbata, Ceramium rubrum, Porphyra sp.),* după recoltare și fixare în formol 3—5% se spală în tăvi emailate într-un jet de apă, apoi se etalează pe foi de celofan fixate pe plăci de sticlă și se usucă la temperatura camerei. Algele macrofite marine astfel etalate și uscate pot fi incluse ulterior în rășini sintetice.

Ciupercile parazite instalate pe diverse organe a plantelor cormofite (frunze, ramuri, spice) se pot incluziona după ce au fost uscate la aer, fără a necesita un tratament deosebit. Macromicetele cărnoase secționate longitudinal (ca și în cazul herborizărilor) obținînd secțiuni de circa 2—3 mm grosime, sînt presate între două sugative poroase, apoi ușor desprinse, deshidratate și fixate pe foi de celofan se trec în formele pregătite pentru incluzionare.

Lichenii recoltați de pe scoarță, sol sau stîncă, se vor lăsa să se usuce pe o coală de sugativă la temperatura camerei, într-o poziție cît mai naturală, după care se pot trece direct în rășină fără a necesita un tratament special.

Briofitele recoltate de pe diferite substraturi (sol, scoarță, stîncă, turbă) care să prezinte atît gametofitul cît și sporofitul, sînt curățate de impurități, presate, uscate și incluse direct în rășini. Lichenii și briofitele incluzionate în rășini își păstrează perfect coloritul natural.

Cormofitele (Pteridophyta, Gimnospermae si Angiospermae). Din grupul plantelor superioare se pot incluziona cu bune rezultate speciile cu habitusul mic și unele tipuri de organe vegetale — rădăcini, fragmente de tulpină, frunze, organe florale, fructe și semințe cu condiția să fie bine deshidratate. În acest scop putem utiliza diverse metode : *uscarea lentă la curent de aer ; uscarea în termostat 3—4 ore ; presarea între foi de hîrtie de filtru ; uscarea între strate de rată hidrofilă ; deshidratarea* în nisip.

Utilizînd aceste metode de deshidratare, avem posibilitatea să incluzionăm diverse diagrame florale, tipuri de inflorescențe, tipuri de fructe etc. În general florile colorate în nuanțe de roșu sau albastru își pierd coloritul natural după includere, deoarece pigmenții flavonoizi prezenți în petale (cianidina, petunidina, delfinidina, peonidina) solubili în apă pierd grupările de tip OH în timpul reacției de polimerizare. În acest caz, pentru a obține piese incluzionate reușite, utilizăm culorile în ulei care s-au dovedit persistente în complexul rășină-catalizator. Prin același procedeu se pot incluziona diverse organe vegetale atacate de o serie de dăunători vegetali și animali (ciuperci, virusuri, insecte).

12.2.2. ANIMALE

Viermii din diverse încrengături : *Platelminți, Nematelminți* sau *Anelide,* se pot incluziona după fixarea lor în alcool 70—75% sau în formol 15%.

Moluștele — reprezentate de lamelibranhiate și gasteropode se pot incluziona fie întregi sau secționate după ce au fost conservate 7—10 zile

în alcool 70%. În cazul includerii cochiliilor, se trec prin băi de alcool sau acetonă.

Crustaceii se conservă înainte de a fi incluși în rășină în alcool 70% sau într-un amestec de formol 5% și glicerină pentru a preveni decalcifierea scheletului extern. Apoi se spală bine într-un curent de apă, se etalează pe o bucată de pluță cu ajutorul acelor de gămălie și se lasă la uscat 5—6 zile.

Insectele

Speciile care prezintă un exoschelet chitinos trebuiesc în prealabil degresate prin fierbere în hidroxid de potasiu și trecerea lor apoi în băi de acetonă, alcool de diverse concentrații sau benzină pură. Insectele de talie mai mare trebuiesc injectate înainte de a fi incluse în rășină, pentru a evita ieșirea aerului din traheide în materialul care polimerizează. Degresarea este o operație absolut necesară pentru a împiedica formarea unei pelicule lucioase la suprafața insectei, fapt care ar denatura aspectul și coloritul natural al speciei respective.

Vertebratele

Peștii

Se pot includ speciile de pești de talie mică (de exemplu speciile de acvariu) care în prealabil au fost injectate cu o soluție de formol 5%. Exemplarele pregătite pentru includere sînt spălate în apă de robinet și apoi sînt trecute succesiv prin băi de alcool cu concentrații diferite. Pentru păstrarea și fixarea diverșilor pigmenți tegumentari se vor ține cîteva ore pînă la cîteva zile pe o placă de sticlă cu care se introduc în diverse soluții fixatoare ca : $CuSO_4$ — 2 g și formal 1000 cc pentru culoarea verde ; KCl — 250 g și formal 1000 cc pentru culoarea argintie.

Amfibienii

Din acest grup de vertebrate se pot include specii cu habitusul mic ca : tritonii *(Triturus sp.)* și broțăceii *(Hyla arborea)*, care se fixează în prealabil într-o soluție formată din : apă 150 g, glicerină 50 g, soluție alaun 50 g.

Reptilele se conservă inițial într-o soluție formată din : formol 300 g, glicerină 300 g și alcool 300 g. Înainte de includere exemplarele de șopîrle, șerpi etc. se vor spăla bine în alcool 70% sau acetonă.

Păsări și mamifere

De la aceste grupe de vertebrate putem include organe sau sisteme de organe interne (sistemul nervos, circulator, digestiv, urogenital) care obținute în urma disecțiilor se păstrează 7—10 zile într-o soluție de formol 3—4% după care se trec succesiv prin seria de alcool 50%—100%.

Folosind această metodă putem realiza piese complexe care să cuprindă evoluția sistemelor de organe în seria animală sau principalele faze ale dezvoltării embrionare la diverse grupe : pești — amfibieni — păsări.

12.2.3. PREGĂTIREA FORMELOR PENTRU INCLUZIUNI

Pentru obținerea preparatelor biologice incluse se folosesc diferite tipuri de forme. Cele mai practice sînt cele care au aspectul unor cutii

care se confecționează din foi de aluminiu și plumb, care sînt maleabile și se desprind cu ușurință de rășină sintetică polimerizată (Fig. 267 A, B).

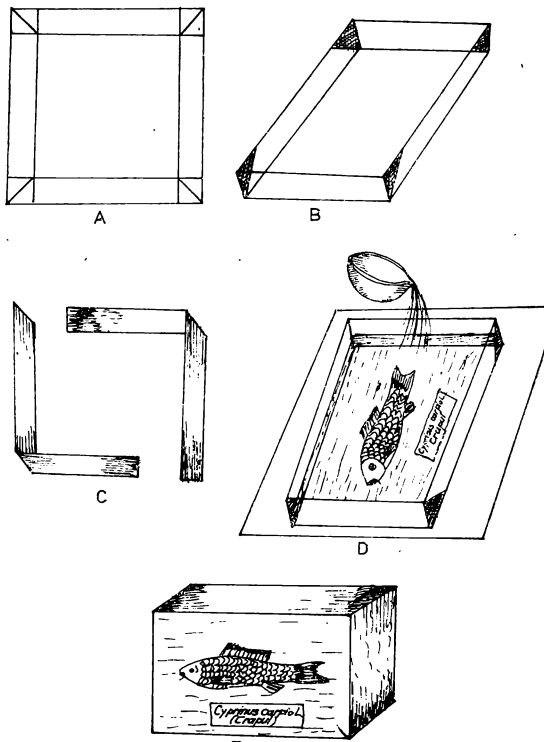


Fig. 267. Etape ale includerii materialelor biologice în rășini sintetice. A. Tiparul unei cutii confecționată din foi de aluminiu și plumb; B. formă utilizată pentru turnarea rășinii sintetice; C. Bare metalice în formă de L; D. turnarea stratelor și fixarea materialului biologic; E. preparat biologic

Se mai utilizează barele metalice de aluminiu în formă de L care formează un careu paralelipipedic de dimensiuni variabile, fixate cu parafină pe o placă de sticlă (Fig. 267 C). În lipsa barelor metalice se utilizează plăci de sticlă care puse cap la cap formează careul paralelipipedic mai sus amintit.

Formele astfel confecționate, înainte de folosire sînt curățate, degresate și uscate.

12.2.4. PREPARAREA RĂȘINII

Rășina procurată de la fabricile de mobilă sau Întreprinderea Polcolor — București se amestecă cu acceleratorul — *naftanatul de cobalt* — în proporție de 2 ml la 100 ml de rășină, apoi se omogenizează bine după care se trece la corectarea culorii galbene a rășinii adăugîndu-se o cantitate mică de *acetat de cupru* dizolvat în *stiren*. După 24 de ore amestecul se poate turna, dar înainte de a efectua această operație se adaugă catalizatorul și anume *butanoxul*, în proporție de 20 picături la 100 ml de rășină. Amestecul se lasă 5—10 minute pentru a se omogeniza și de a se elimina bulele de aer, după care se trece la turnarea stratelor.

12.2.5. TURNAREA STRATELOR

După limpezirea amestecului, acesta se toarnă în forme, primul strat turnat este de circa 5 mm și el se polimerizează după 4—6 ore. Apoi se trece la fixarea materialului biologic pregătit pentru incluzionat împreună cu eticheta confecționată din celofan sau din material plastic incolor, pe care se scrie cu tuș denumirea științifică și populară a materialului inclus (Fig. 267 D, E).

Dacă primul strat este puternic solidificat este bine să se prepare o cantitate mică de rășină cu care se unge materialul biologic pe partea inferioară pentru a adera mai ușor la primul strat de rășină. Apoi se toarnă al doilea strat de 1 cm și se lasă pînă se polimerizează, după care se toarnă straturile următoare, numărul lor fiind în funcție de înălțimea preparatului. După întărirea ultimului strat, preparatul inclus se lasă 3—4 zile pentru a se consolida.

12.2.6. FINIZAREA

Incluziunile scoase din forme vor suferi o serie de operații de ordin mecanic.

Îndreptarea fețelor incluziunii și aducerea lor la un anumit plan se poate realiza folosind două metode :

1. Șlefuirea uscată cu ajutorul unei pietre de polizor cu granulația 6 sau cu ajutorul mașinii de șlefuit (Fing. 268).

2. Șlefuirea umedă pe un șmirghel de apă (hîrtie hidrorezistentă) de granulație diferită (400—500—600) fixat pe discurile mașinii de șlefuit.

După șlefuire, piesele apar opace iar pentru lustruirea și transparentizarea lor se folosește o perie de bumbac atașată la un polizor, îmbibată cu o pastă de crom de culoare verde. Această operație se execută după 5—6 zile de la șlefuire.

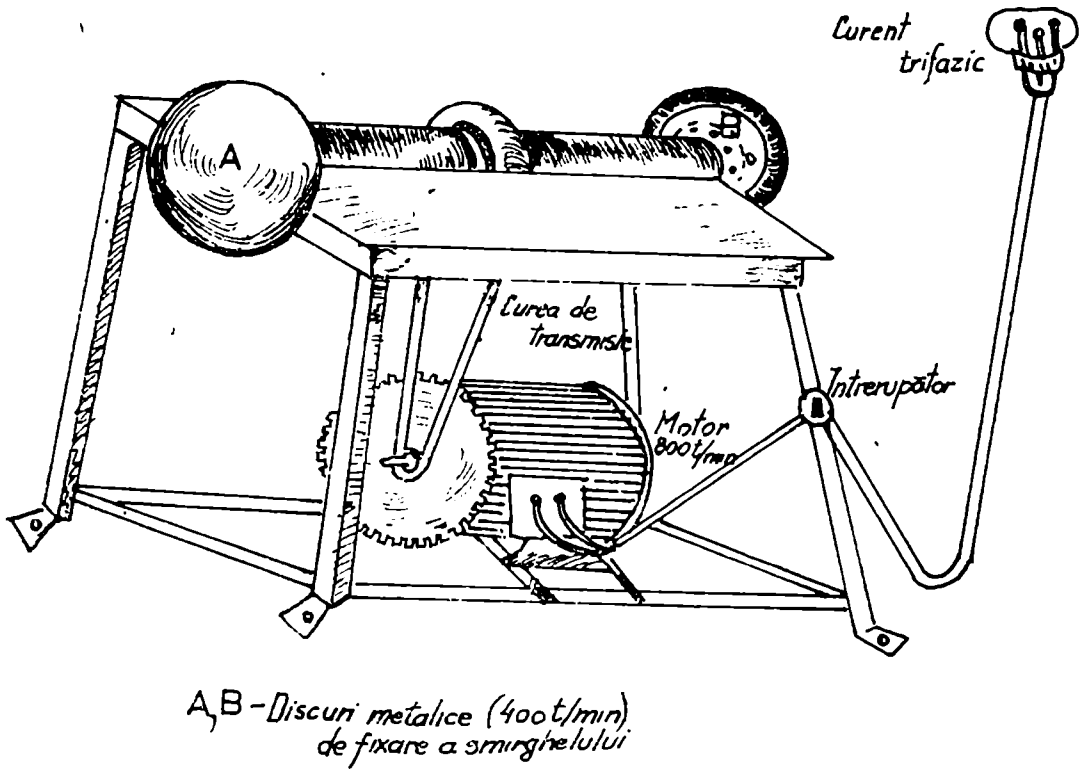


Fig. 268. Mașină utilizată la șlefuirea pieselor incluzionate, incluse în rășini sintetice.

12.2.7. NORME DE SECURITATE

Ținînd seama de acțiunea dăunătoarea a vaporilor degajați de aceste rășini poliesterice și acțiunea corozivă a pastei catalitice trebuie avut în vedere ca : operația de includere să se facă sub nișă ; protejarea mîinilor cu mănuși chirurgicale ; spălarea mîinilor de rășină cu acetonă sau tiner ; aerisirea încăperii de lucru.

Piesele biologice astfel obținute au o mare valoare didactică și muzeografică, ele constituind un material biologic durabil, accesibil observării și analizării în bune condiții a materialului biologic care își menține forma, mărimea, culoarea naturală (Fig. 267 E).

Se pot realiza adevărate expoziții cu plante atacate, insecte de pădure, insecte de apă, plante ocrotite, colecții de ciuperci, licheni, briofite și chiar de plante superioare.

Această metodă de naturalizare, preparare și păstrare a materialului biologic, este foarte utilă învățămîntului gimnazial, liceal și superior, precum și muzeelor de științe naturale de pe tot cuprinsul țării.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

AILIESEI O., NIMIȚIAN E., COMĂNESCU ST., 1980, *Lucrări practice de Microbiologie generală*, Univ. Al. I. Cuza — Iași.

ANGHEL I., TOMA N., VASSU TATIANA, MOISA I., CIRCIUMĂRESCU DOINA, 1985, *Genetica microorganismelor. Principii și tehnici de laborator*, Universitatea din București.

ANGHEL I., UNTU C., TUDOR C., MEȘTER L., NĂSTĂSESCU M., TOMA N., GREGORIAN L., NIȚESCU E., 1976, *Practicum le Biologie*, Universitatea din București.

ANTIPA GR., 1923, *Organizarea muzeelor în România*. București.

BARBU P., POPESCU A., 1975, *Zoologia vertebratelor*, Universitatea București.

CIOCHIA V., 1984, *Dinamica și migrația păsărilor*, Edit. Șt. și Enciclopedică. București.

COTTA V., BODEA M., 1969, *Vinatul României*, Edit. Agrosilvică, București.

FIRA V., SUCIU M., NĂSTĂSESCU M., 1974, *Zoologia nevertebratelor, manual de lucrări practice*, Universitatea din București.

GABE M., 1968, *Techniques histologiques*, Ed. Masson et Cie, Paris.

GHELASE GH. I., 1951, *Tehnica pescuitului*, vol. II, Ed. Tehnică, București.

HULEA A., 1969, *Ghid pentru laboratoarele de micologie și bacteriologie*, Ed. Agrosilvică, București.

KASZONI Z., 1964, *Acvaristica și pescuitul sportiv*, Ed. Științifică, București.

LĂCĂTUȘU M., TUDOR C., TEODORESCU I., 1974, *Lucrări practice de Entomologie*, Universitatea din București.

LAZĂR I., PRUNESCU C., 1978, *Tehnici de laborator în biologie*, Ed. didactică și pedagogică.

MIȘCALENCU D., MAILAT FL., MARCU E., 1973, *Anatomia comparată a vertebratelor. Caiet de lucrări practice*. Centrul de multiplicare al Univ. din București.

MUREȘAN E., 1974, *Tehnici de histologie normală și patologică*. Ed. Ceres, București.

MURGOCI A., 1962, *Curs de capitole speciale de entomologie și metode de creștere a insectelor utile*, Ed. didactică și pedagogică, București.

NĂSTASE I., 1969, *Cum putem crește insecte în laborator ?* Natura nr. 1, p. 65—69.

NESTORESCU N., 1965, *Bacteriologie medicală*, Ed. medicală, București.

NIKOLSKI G. V., 1962, *Ecologia peștilor*, București (traducere din lb. rusă).

PAPADOPOL M., 1970, *Indicații practice privind acvaristica*. Natura nr. 6, p. 73—76 ; 1971, nr. 1, p. 69—73.

PAPADOPOL M., 1970, *Îndrumări privind cercetarea, prepararea și conservarea păsărilor*, Natura nr. 3 și 4.

PAPADOPOL A., 1972, *Indrumări practice cu privire la confecționarea și conservarea preparatelor zoologice macroscopice în scop didactic.* În ajutorul profesorului de biologie, S.S.B., București.

PICOȘ C. A., 1978, *Lucrări practice de fiziologie animală,* Univ. din București

POP E. C., ROSENTHAL CORA, SPĂTARU CARMEN, RUSU CLEOPATRA, 1978, *Apicultură și sericicultură,* Ed. didactică și pedagogică, București,

POPESCU A., 1971, *Metode de cercetare a mamiferelor mici (insectivore, rozătoare și chiroptere) din fauna țării noastre.* În ajutorul profesorului de biologie, nr. 5.

POPESCU A., 1974, *Citeva criterii de determinarea vîrstei la unele vertebrate,* Natura nr. 4, p. 83—91.

RAICU P., ANGHEL I., STOIAN VERONICA, DUMA DOINA, TĂISESCU ELENA, BADEA ELENA, GREGORIAN LILIANA, 1983, *Genetica, metode de laborator,* Ed. Academiei R. S. România.

SANTA N., BOGOESCU C., STOICA M., BOLDOR ST., ANDREESCU B., POPOVICI L. A., 1962, *Demonstrații și lucrări practice de zoologie, anatomie și fiziologie,* Ed. didactică și pedagogică, București.

SPĂTARU LIA CARMEN, RUSU CLEOPATRA, ADLER ALEXANDRINA, SABĂU A., 1983, *Apicultură și sericicultură,* Ed. didactică și pedagogică, București.

STOICA M., MIHĂILESCU I., 1981, *Lucrări practice de anatomie și fiziologie animală,* Unviersitatea din București.

STRUNGARU GR., VASILESCU E., NĂSTĂSESCU GH., NISTOR M., FLONTA M. L., 1983, *Indrumător de lucrări practice de fiziologie animalelor,* Universitatea din București.

SUCIU M., POPESCU A., 1981, *Lucrări practice de zoologie,* Ediția II-a, Ed. didactică și pedagogică, București.

ZARNEA G., 1983, *Tratat de microbiologie generală,* Ed. Academiei R.S.R., vol. I,

* * * 1983, *Manualul apicultorului,* Asociația crescătorilor de albine din R.S.R, București.

Dat la cules 11.I.1989. Bun de tipar 17.II.1989
Coli tipografice 24,5. Tiraj 3500 exemplare.

Tiparul s-a efectuat sub c-da. nr. 278 la
Tipografia Universității din București